

**Morphologische und funktionelle Charakterisierung von
Genmutationen in Toll-like Rezeptor (TLR) 2 und TLR4
bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen
im intestinalen Epithel**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät
Biologie und Geografie

an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Annette Eyking
aus Emmerich am Rhein

September 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Essens in der Arbeitsgruppe "Gastrointestinale Immunologie" unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Elke Cario durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Elke Cario
2. Gutachter: Prof. Dr. Bertram Opalka
3. Gutachter: Prof. Dr. Ann Ehrenhofer-Murray

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Shirley Knauer

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Januar 2011

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zum Teil finanziell gefördert durch:

- Crohn´s and Colitis Foundation of America – CCFA
(Senior Research Award #1790; E. Cario)
- Deutsche Forschungsgemeinschaft – DFG
(Sachbeihilfen; E. Cario)
- Interne Forschungsförderung – IFORES
(Bonusprogramm; E. Cario)

Teile der vorliegenden Dissertation wurden zuvor publiziert oder auf Kongressen präsentiert.

1. Originalpublikationen

- 1) Podolsky DK, Gerken G, **Eyking A**, Cario E.
“Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair due to TFF3 deficiency”
Gastroenterology 2009; 137(1): 209-20
- 2) Ey B+, **Eyking A+**, Gerken G, Podolsky DK, Cario E.
“TLR2 mediates gap junctional intercellular communication through Connexin-43 in intestinal epithelial barrier injury”
(+ Ko-Erstautoren, in alphabetischer Reihenfolge)
J Biol Chem 2009; 284(33): 22332-43

2. Präsentationen

* : markiert Referent

- 1) **Eyking A**, Podolsky DK, Cario E*.
“Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair due to TFF3 deficiency”
Gastroenterology 2009; 136: S280
(Vortrag: Basic Science Plenary Session – American Gastroenterological Association; Digestive Disease Week 2009; Chicago, USA)
- 2) **Eyking A***, Gerken G, Podolsky DK, Cario E.
“Ulcerative colitis – associated TLR2 mutant impairs wound repair responses of the intestinal epithelium”
Eur J Immunol 2009; Suppl: S45
(Vortrag und Poster: 2nd European Congress of Immunology 2009; Berlin)

- 3) Ey B+, **Eyking A+**, Gerken G, Podolsky DK, Cario E*.

“TLR2-mediated control of gap junctional intercellular communication essentially contributes to intestinal epithelial barrier homeostasis during acute and chronic colitis”

(+ Ko-Erstautoren, in alphabetischer Reihenfolge)

Inflamm Bowel Dis 2009; 15 (Supl.): S46

(Vortrag: Basic Overall Track – 2009 Advances in Inflammatory Bowel Disease, Crohn's and Colitis Foundation of America Clinical & Research Conference; Miami, USA – ausgezeichnet als **Best Overall Abstract**)

- 4) **Eyking A***, Gerken G, Podolsky DK, Cario E.

“The human variant D299G of the TLR4 gene links inflammation and cancer progression in the intestinal epithelium”

Gastroenterology 2010; 138: S78

(Vortrag: Research Forum Session – American Gastroenterological Association; Digestive Disease Week 2010; New Orleans, USA)

- 5) **Eyking A***, Ey B, Gerken G, Podolsky DK, Cario E.

“Der TLR4-Polymorphismus D299G fördert die entzündungsassoziierte Tumorprogression im intestinalen Epithel”

Z. Gastroenterol 2010; 48

DOI: 10.1055/s-0030-1263411

(angenommen als Vortrag bei der 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten – Viszeralmedizin 2010, Stuttgart; September 2010)

Inhaltsverzeichnis

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>11</u>
<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>14</u>
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>15</u>
<u>1. Einleitung</u>	<u>21</u>
1.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)	21
1.2. Toll-like Rezeptoren (TLR)	24
1.2.1. TLR-Polymorphismen	28
1.3. Das mukosale Immunsystem	30
1.4. Das intestinale Epithel	31
1.4.1. Caco-2-Zellen als Zellkulturmodell der intestinalen Epithelzellen	35
1.5. Colitis-assoziiertes Colonkarzinom	36
1.6. Zielsetzung	38
<u>2. Material und Methoden</u>	<u>40</u>
2.1. Materialien, Chemikalien und Geräte	40
2.1.1. Materialien	40
2.1.2. Chemische Substanzen	41
2.1.3. Enzyme	43
2.1.4. Größenstandards	44
2.1.5. Geräte	44
2.1.6. Lösungen und Puffer	45
2.1.7. Kits	47
2.1.8. Zellkulturmedien	48
2.2. Methoden	48
2.2.1. Kultivierung von Caco-2-Zellen	48
2.2.2. Kultivierung von IEC-6-Zellen	49
2.2.3. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	50
2.2.4. Einfrieren und Auftauen von Caco-2-Zellen	50

2.2.5. Herstellung stabil transfizierter Caco-2-Zellen	51
2.2.5.1. Vermehrung und Präparation der TLR-Plasmid-DNA	51
2.2.5.2. Überprüfung der Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau	53
2.2.5.3. Agarose-Gelelektrophorese	54
2.2.5.4. Herstellung der mutierten Vektoren	55
2.2.5.5. Klonierung der mutierten Vektoren	55
2.2.5.6. Stabile Transfektion der Caco-2-Zellen	55
2.2.5.7. Selektion einzelner Klone	56
2.2.5.8. Kultivierung der stabil transfizierten Klone	57
2.2.6. Ausplattieren für die Ernte von mRNA, Protein und konditioniertem Medium	57
2.2.7. Ernte von konditioniertem Medium	57
2.2.8. Aufkonzentrieren von konditioniertem Medium	58
2.2.9. Molekularbiologische Methoden	58
2.2.9.1. Aufnahme der Zellen in " <i>TRI-Reagenz</i> "	58
2.2.9.2. Isolation von " <i>messenger-RNA</i> " (mRNA)	58
2.2.9.3. Reverse Transkription von mRNA in cDNA	59
2.2.9.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	60
2.2.9.5. Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	60
2.2.9.6. Quantitative Realtime RT-PCR	62
2.2.10. Proteinnachweismethoden	64
2.2.10.1. Herstellung eines Gesamt-Protein-Zelllysates	64
2.2.10.2. Herstellung eines Proteinlysates verschiedener Zell-Kompartimente	64
2.2.10.3. Proteinbestimmung nach Bradford	65
2.2.10.4. Western-Blot (Immunoblot)	65
2.2.10.5. Anfärbung des Western-Blot Gels mit " <i>Simply Blue</i> "	69
2.2.10.6. Western-Blot reprobieren	70
2.2.10.7. Immunfluoreszenzfärbungen	70
2.2.10.8. Direkte Immunfluoreszenzfärbung	71
2.2.10.9. Phalloidin Färbung	71
2.2.10.10. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	71
2.2.10.11. Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen am Laser Scanning Mikroskop	74

2.2.10.12. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	74
2.2.11. Nachweis der Proliferation (BrdU-Assay)	75
2.2.12. Nachweis der metabolischen Aktivität von Zellen	75
2.2.13. Messung des transepithelialen Widerstandes (TER)	76
2.2.14. Matrigel®-Invasionsversuch	77
2.2.15. Kristallviolett-färbung der Matrigel®-Inserts	78
2.2.16. <i>"Scrape wounding Assay"</i>	78
2.2.17. Untersuchung der Restitution durch Migration	79
2.2.18. Xenograft-Modell	79
2.2.19. Anfertigung von Gefrierschnitten	80
2.2.20. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H/E-Färbung)	81
2.2.21. Statistik	81
3. Ergebnisse	82
<hr/>	
3.1. Überprüfung der Plasmidpräparationen auf ihr Insert	82
3.1.1. TLR2-Plasmide	82
3.1.2. TLR4-Plasmide	82
3.2. Überprüfung der stabilen Transfektionseffizienz	83
3.2.1. TLR2-Klone	83
3.2.2. TLR4-Klone	84
3.3. Untersuchungen zum Einfluss von TLR2 und der TLR2-Variante R753Q auf die Homöostase und Restitution der intestinalen Epithelbarriere	87
3.3.1. Differenzierung	88
3.3.2. Proliferation	90
3.3.3. Metabolische Aktivität	91
3.3.4. Zell-Zell-Kommunikation	92
3.3.4.1. Gen- und Proteinexpression von Cx43 und ZO-1	92
3.3.4.2. Funktioneller Nachweis der Zell-Zell-Kommunikation nach Verwundung	95
3.3.4.3. Einfluss des Proteasoms auf den Abbau des Cx43-Proteins im TLR2-R753Q-Klon	97
3.3.5. Restitution	100
3.3.5.1. Peptidexpression von "TFF3"	100

3.3.5.2. Einfluss konditionierter Medien auf die Wundheilung von IEC-6-Zellen	102
3.4. Morphologische und funktionelle Untersuchungen von TLR4-FL und den CED-assoziierten Polymorphismen TLR4-T399I und TLR4-D299G im intestinalen Epithel	104
3.4.1. Morphologie	104
3.4.2. Aktinzytoskelett	106
3.4.3. Proliferation	108
3.4.4. Metabolische Aktivität	109
3.4.5. Analyse der Mitosen	110
3.4.6. Regulation der Barrierefunktion, Entzündungsmediatoren und Tumorentstehung	112
3.4.6.1. Barrierefunktion	113
3.4.6.2. Entzündungsmediatoren	116
3.4.6.3. Tumorentstehung	122
3.4.7. Invasivität	127
3.4.7.1. Matrigel® Invasionsversuch	127
3.4.7.2. Mechanismus des invasiven Wachstums des TLR4-D299G-Klons	129
3.4.8. Untersuchung der Tumorentstehung des TLR4-D299G-Klons im Xenograft-Modell <i>in vivo</i>	130
3.4.9. Histopathologie der Xenograft-Tumoren	132
4. Diskussion	136
4.1. Einfluss von TLR2 und des Colitis ulcerosa-assoziierten Polymorphismus TLR2-R753Q auf die Homöostase und Restitution der intestinalen Epithelbarriere	136
4.2. Morphologische und funktionelle Charakterisierung von TLR4-FL und den CED-assoziierten Polymorphismen TLR4-T399I und TLR4-D299G im intestinalen Epithel	146

<u>5. Zusammenfassung</u>	<u>156</u>
---------------------------	------------

<u>6. Anhang</u>	<u>158</u>
------------------	------------

6.1. Vektorkarte pUNO-TLR2-FL und Sequenzausschnitt der Mutation TLR2-R753Q	158
--	-----

6.2. Vektorkarte pUNO-TLR4-FL und Sequenzausschnitte der beiden Mutationen TLR4-T399I und TLR4-D299G	159
---	-----

<u>7. Literaturverzeichnis</u>	<u>161</u>
--------------------------------	------------

<u>Danksagungen</u>	<u>174</u>
---------------------	------------

<u>Lebenslauf</u>	<u>175</u>
-------------------	------------

<u>Erklärung</u>	<u>175</u>
------------------	------------

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1. Modell zur CED-Pathogenese	23
Abb.1.2. TLRs und ihre Liganden	25
Abb.1.3. TLR-Signalweg	27
Abb.1.4. Aufbau des intestinalen Epithels	32
Abb.2.1. Aufbau des Blottingmoduls	66
Abb.3.1. Gen- und Proteinexpression von TLR2HA, endogenem TLR2 und GAPDH in den TLR2-Klonen	84
Abb.3.2. Überprüfung der Expression der Transgene der TLR4-Klone durch semiquantitative RT-PCR (A), Western-Blot (B) und Immunfluoreszenzfärbung (C)	86
Abb.3.3. Funktioneller Nachweis des Differenzierungsgrads der TLR2-Klone basal (A) und nach Stimulation mit PCSK (B)	89
Abb.3.4. Sucrase-Isomaltase (SI) Genexpression in den TLR2-Klonen	89
Abb.3.5. Proliferationsverhalten der TLR2-Klone	90
Abb.3.6. Metabolische Aktivität der TLR2-Klone	91
Abb.3.7. Genexpression von Cx43 und ZO-1	92
Abb.3.8. Proteinexpression von Cx43, ZO-1, HA und GAPDH in fraktionierten TLR2-FL-, TLR2-R753Q- und TLR4-FL-Zellen	93
Abb.3.9. Proteinexpressionsmuster von Cx43 und ZO-1 in einer Immunfluoreszenzfärbung	95
Abb.3.10. Funktioneller Nachweis der Zell-Zell-Kommunikation nach Verwundung	96
Abb.3.11. Inhibition des Proteasoms verhindert Cx43-Abbau im TLR2-R753Q-Klon	98
Abb.3.12. Proteinexpression von BIP/GRP78 in den TLR2-Klonen	99
Abb.3.13. Intrazelluläre Peptidproduktion von TFF3 im TLR2-FL- und TLR2-R753Q-Klon	101
Abb.3.14. Sekretion von TFF3	101
Abb.3.15. Einfluss von konditioniertem Medium (kM) von Caco-2-Zellen, den TLR2-Klonen und TFF3 auf die Migration von verwundeten IEC-6 Zellen	103

Abb.3.16. Lichtmikroskopische Charakterisierung untransfizierter Caco-2-Zellen und der TLR4-Klone	105
Abb.3.17. Phalloidininfärbung untransfizierter Caco-2-Zellen und der TLR4-Klone	107
Abb.3.18. Proliferationsverhalten der TLR4-Klone	108
Abb.3.19. Metabolische Aktivität der TLR4-Klone	109
Abb.3.20. Immunfluoreszenzfärbung der Mitosen in den TLR4-Klonen	111
Abb.3.21. mRNA Genexpression von Cx43 in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen	113
Abb.3.22. Proteinexpression von Cx43	114
Abb.3.23. mRNA Genexpression von SI in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen	115
Abb.3.24. mRNA Genexpression von IL2RG (A) und ANXA1 (B) in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen	116
Abb.3.25. Proteinexpression von BIP/GRP78 in den TLR4-Klonen	117
Abb.3.26. mRNA Genexpression von A2M (A) und TFPI (B) in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen	118
Abb.3.27. Sekretion der Koagulationsfaktoren A2M (A) und TFPI (B)	119
Abb.3.28. mRNA Genexpression von C3 (A) und C5 (B) in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen	120
Abb.3.29. Sekretion der Komplementfaktoren C3a (A) und C5a (B)	121
Abb.3.30. mRNA Genexpression von COX-2 in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen	122
Abb.3.31. Proteinexpression von COX-2	123
Abb.3.32. mRNA Genexpression von cMyc in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen	124
Abb.3.33. Proteinexpression von cMyc	125
Abb.3.34. mRNA Genexpression von STAT3 in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen	125

Abb.3.35. Proteinexpression und Aktivierung von STAT3	126
Abb.3.36. Kristallviolett-Färbung invertierter Matrigel®-Kultureinsätze auf invasives Wachstum	128
Abb.3.37. Kristallviolett-Färbung von unbehandelten (A) und STAT3-inhibierten TLR4-D299G-Zellen (B)	129
Abb.3.38. Wachstumskinetik der Xenograft-Tumoren	131
Abb.3.39. Dokumentation der TLR4-FL- und TLR4-D299G-Tumore in situ und präpariert	132
Abb.3.40. Histopathologie der Xenograft-Tumore nach H/E-Färbung	133
Abb.3.41. Immunfluoreszenzfärbung für Pan-Zytokeratin der Xenograft-Tumore	135
Abb.6.1. Vektorkarte pUNO-TLR2-FL der Firma InvivoGen	158
Abb.6.2. Vektorkarte pUNO-TLR4-FL der Firma InvivoGen	159

Tabellenverzeichnis

Tab.2.1. Ansätze für die Mastermixe der Restriktionsverdauung für die pUNO-TLR2-HA und pUNO-TLR4-HA Vektoren	53
Tab.2.2. Mastermix für die Reverse Transkription mit dem <i>"Sensiscript Reverse Transcription Kit"</i>	59
Tab.2.3. Verwendete Primer für die RT-PCR	61
Tab.2.4. Mastermix für die RT-PCR	62
Tab.2.5. Verwendete Realtime Primer (<i>"QuantiTect Primer Assays"</i> , Qiagen)	63
Tab.2.6. Western-Blot Erstantikörper und ihre Anwendung	68
Tab.2.7. Erstantikörper für die indirekte Immunfärbung und ihre Anwendung	72
Tab.2.8. Sekundärantikörper für die indirekte Immunfärbungen und ihre Anwendungen	73

Abkürzungsverzeichnis

A2M	Alpha-2-Makroglobulin
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
ANXA	Annexin A1
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATG16L	<i>Autophagy-related 16-like</i>
AOM	Azoxymethan
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
Apc	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
BCP	Bromochloropropan
BHT	<i>Butylated Hydroxytoluene</i>
BIP/GRP78	<i>Binding Protein/Glucose-regulated Protein 78b</i>
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
C3	Komplementfaktor 3
C5	Komplementfaktor 5
Ca ²⁺	Kalzium
CARD15	<i>Caspase Recruitment Domain 15</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CHR	Chromatographie
CMV	Cytomegalovirus
COX-2	Cyclooxygenase-2
Cx43	Connexin 43
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DMBA	7,12-Dimethylbenz(a)anthracen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSS	Dextran-Sodium-Sulfat
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	<i>full length</i>
GALT	<i>Gut associated lymphoid tissue</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
HCl	Salzsäure
H/E-Färbung	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293 Zellen</i>
HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex
HRP	<i>Horseradishperoxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IBD1	<i>Inflammatory Bowel Disease 1</i>
IEC	<i>Intestinal epithelial cell</i> (intestinale Epithelzelle)
IFN	Interferon
IκB	<i>Inhibitor κB</i>
IL	Interleukin
IL23R	Interleukin-23 Rezeptor
IL2RG	Interleukin-2 Rezeptor Gamma
IgG	Immunglobulin G
IP-10	<i>Interferon-γ-inducible protein of 10kDa</i>
IRAK	<i>Interleukin-1-Receptor-associated-kinase</i>

IRF3	<i>Interferon-regulatory factor 3</i>
Jnk	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kM	konditioniertes Medium
LB	Luria Bertani
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine rich repeat</i>
Mal	<i>MyD88 adaptor like</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MD-2	<i>Myeloid differentiation factor-2</i>
MEK	<i>Mitogen-activated ERK-kinase</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
Mg ²⁺	Magnesium
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MNV	muriner Novovirus
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(sulfophenyl-2H-tetrazolium)
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor</i>
NOD-2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain 2</i>
nu/nu	"nackt" homozygot
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline</i> mit Tween-20
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PCSK	Pam ₃ CySK4
PET	Polyethylen Terephthalat
PES	Phenazin Ethosulfat
Pfa	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin 2
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
pSTAT3	phospho STAT3
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
rTFF3	rekombinantes TFF3
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion
SARM	<i>Sterile-α- and armadillo-motif-containing protein</i>
SDS	Sodium-Dodecyl Sulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SI	Sucrase-Isomaltase
SIGIRR	<i>Single immunoglobulin IL-1R-related molecule</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPF	<i>Specific Pathogen free</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and activator of transcription 3</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris Buffered Saline</i> mit Tween-20
TE	Tris/EDTA-Puffer
TER	Transepithelialer Widerstand
TFF3	<i>Trefoil Factor 3</i>

T _H	T-Helferzelle
TIR-Domäne	Toll-Interleukin-1 (IL-1)-Rezeptor-Domäne
TIRAP	<i>TIR domain containing adaptor protein</i>
TFPI	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TRAF6	<i>Tumor-Necrosis-Factor-associated Factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain containing adaptor protein inducing Interferon-β</i>
UV	Ultraviolett
Var	Variante
Wnt	<i>Wingless/int</i>
ZO-1	Zonula occludens-1

*Gewidmet denen, die mich geliebt, gefördert und geformt haben
– besonders meinen Eltern und meinem Bruder*

1. Einleitung

1.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Unter dem Begriff der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden rezidivierend verlaufende, chronische Entzündungen des Gastrointestinaltraktes zusammengefasst. Die beiden Hauptformen der CED sind Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Beide Erkrankungen werden anhand von klinischen, histologischen, labordiagnostischen, endoskopischen und radiologischen Untersuchungen empirisch definiert und diagnostiziert [3, 188]. Dabei überschneiden sich Morbus Crohn und Colitis ulcerosa in ihrer Symptomatik und sind oft schwer zu differenzieren und zu diagnostizieren.

CED treten vermehrt zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr auf, wobei die Prävalenz ansteigend ist, da immer mehr junge Menschen und auch Kinder häufiger betroffen sind. Weltweit sind ca. 0,1-1% der Bevölkerung an CED erkrankt [35, 84, 105]. Sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa kommt es zu familiär gehäuften Erkrankungen, so dass von einer genetischen Prädisposition ausgegangen wird [126, 173].

Obwohl Colitis ulcerosa schon im 19. Jahrhundert und Morbus Crohn 1932 erstmals beschrieben wurden, ist die Ätio-Pathogenese von CED noch nicht eindeutig geklärt und eine Heilung bislang nicht möglich. Daher ist die Erforschung möglicher molekularer Mechanismen, die CED verursachen oder stimulieren ("triggern") können, wichtig, um zur Entwicklung neuer Therapien beizutragen. Nach dem heutigen Wissensstand kommt es bei einer CED in einem genetisch prädisponierten Individuum zu einer fehlerhaften, hyperaktiven Reaktion des mukosalen Immunsystems auf lumenale Bakterien der kommensalen Mikroflora. Zusätzlich wird von triggernden Einflüssen von Umweltfaktoren, wie z.B. Ernährung, Hygiene oder psychologischen Faktoren, ausgegangen [188].

In ihren Krankheitsbildern sind sich Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ähnlich. Morbus Crohn wird meistens mit einer segmentalen, transmuralen Entzündung beschrieben, so dass sich entzündete Darmabschnitte mit gesunden abwechseln. Dabei kann der gesamte Gastrointestinaltrakt betroffen sein. Das terminale Ileum ist oft beteiligt und die ersten mukosalen Läsionen treten in den Peyer-Plaques auf. Pathologisch zeigen sich Aggregate von Makrophagen, die typischerweise

Granulome bilden können [188]. Die Hauptmerkmale einer Colitis ulcerosa beinhalten eine diffuse mukosale Entzündung, die sich vom Rektum nach proximal kontinuierlich ausbreitet und nur das Colon betrifft. Zusammen mit einer schweren Entzündung und der Produktion vieler Entzündungsmediatoren bilden sich ausgebreitete, oberflächliche mukosale Ulzerationen (Wunden). In der Histologie sind Infiltrate von neutrophilen Granulozyten in der Lamina Propria und den Krypten sichtbar und bilden sogenannte Kryptenabzesse. Zusätzlich wird ein Mangel an Mucinen, die in Becherzellen gebildet werden können, beobachtet [188]. Der langwierige Krankheitsverlauf beider Erkrankungen ist individuell unterschiedlich, von akut bis chronisch und beinhaltet akute, schubweise auftretende Phasen schwerer Entzündungen. Seltene Komplikationen können lebensbedrohlich sein (z.B. toxisches Megacolon bei Colitis ulcerosa). CED-Patienten müssen dementsprechend langwierig medikamentös behandelt werden, wobei die Therapie meist aus anti-inflammatorischen, immunsupprimierenden und immunmodulierenden Medikamenten besteht [120].

Im letzten Jahrzehnt wurden bedeutende Fortschritte durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) in der Aufklärung der Pathogenese der CED gemacht. In diesen wurden einige Gene und Chromosomenabschnitte identifiziert, die mit CED signifikant assoziiert sind. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Gene der angeborenen und adaptiven Immunität, Barrierefunktion, Autophagie und Phagozytose [3, 45, 72, 146, 188]. Mutationen in NOD2 (*"Nucleotide-binding oligomerization domain 2"*) (auch CARD15 (*"Caspase Recruitment Domain 15"*) bzw. IBD1 (*"Inflammatory Bowel Disease 1"*) genannt), IL23R (Interleukin-23 Rezeptor) und in dem Autophagie-Gen ATG16L (*"Autophagy-related 16-like"*) stellen dabei derzeit die wichtigsten Risikofaktoren für Morbus Crohn dar [45, 72, 79, 125]. Für Colitis ulcerosa wurden vor Kurzem in einer GWAS in einem europäischen Kollektiv mit ca. 2700 Colitis ulcerosa-Patienten und ca. 6800 Gesundkontrollen mehr als 30 Suszeptibilitätsloci identifiziert. Hierbei waren auch Gene, die in der angeborenen und adaptiven Immunität Hauptregulationsfunktionen besitzen [116].

Insgesamt ist das Krankheitsbild der CED heterogen, so dass nicht alle Patienten Mutationen in den Suszeptibilitätsgenen aufweisen. Diese Heterogenität legt nahe, dass es verschiedene CED-Patientensubgruppen mit unterschiedlichen Geno- und Phänotypen gibt. Nach den breit angelegten GWAS müssen nun präzisere Analysen von Patientensubgruppen und –subphänotypen folgen. Diese Untersuchungen

könnten auch zu der Entwicklung von besseren, auf den Geno- und Phänotyp abgestimmten, Therapien führen.

Die Funktion der bisher identifizierten Risikogene ist bislang weitestgehend unklar, und es wird die Aufgabe der nächsten Jahren sein, die molekularen und zellbiologischen Auswirkungen dieser Mutationen aufzuklären. Es wird davon ausgegangen, dass noch viel mehr Gene, bzw. ihre Varianten an der Entstehung von CED beteiligt sind, bzw. den Krankheitsverlauf interaktiv und komplex modulieren, die in den GWAS bisher nicht identifiziert wurden.

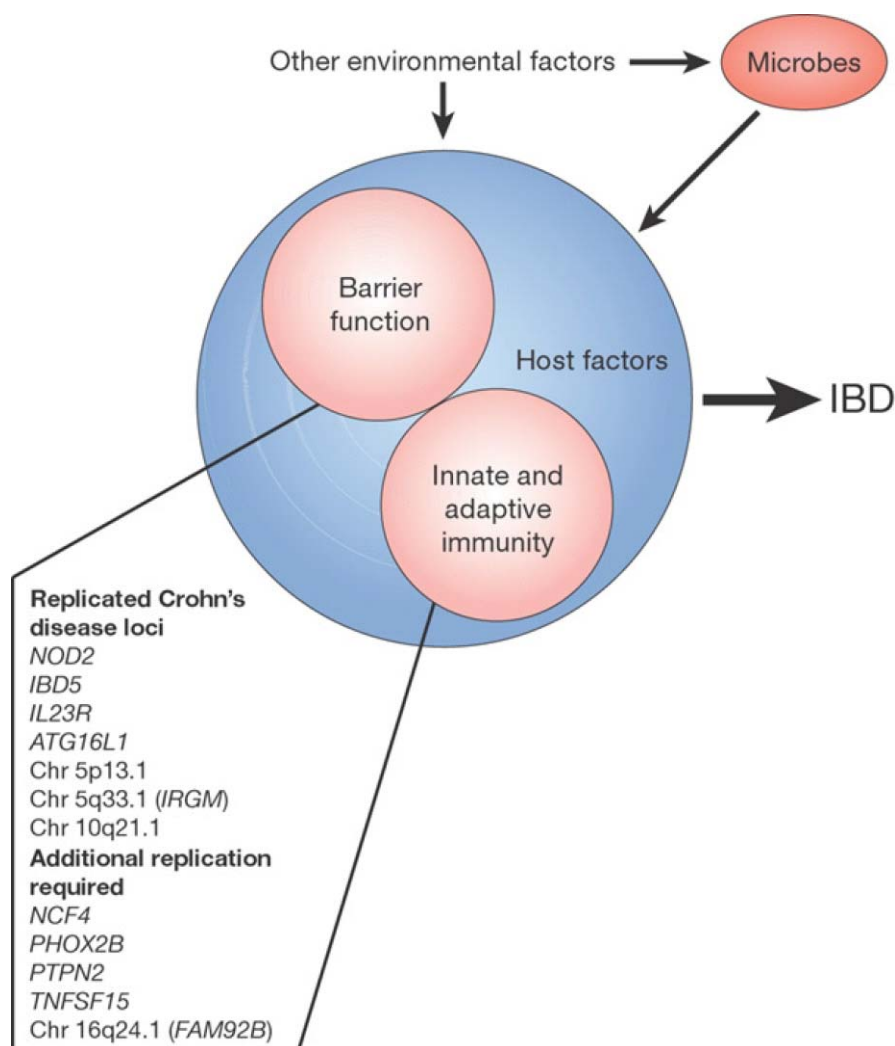


Abb.1.1. Modell zur CED-Pathogenese, entnommen aus [188]. Intestinale Entzündungen in CED ("IBD") resultieren aus einer fehlerhaften, hyperaktiven Reaktion des mukosalen Immunsystems auf lumenale Bakterien der kommensalen Mikroflora ("Microbes") in einem genetisch prädisponierten Individuum. Dabei tragen Umweltfaktoren ("environmental factors"), und/oder genetische Faktoren des CED-Patienten ("Host factors"), sog. Risikogene ("Replicated Crohn's disease loci", "Additional replication required") zur fehlerhaften Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems ("Innate and adaptive immunity") und zur Schwächung der Barrierefunktion des intestinalen Epithels bzw. der Mukosa bei ("Barrier function").

Zusätzlich zur genetischen Prädisposition gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass das dynamische Gleichgewicht zwischen kommensaler Mikroflora und den Abwehrmechanismen des Immunsystems der mukosalen Barriere eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Pathogenese von CED spielt. In CED-Patienten scheint die kommensale Mikroflora anders zusammengesetzt zu sein [41, 161, 165]. Studien mit verschiedenen genetisch-veränderten Mausstämmen belegen den proinflammatorischen Einfluss der residenten Mikroflora [48, 151]. Im gnotobiotischen (keimfreien) Zustand entwickelten einige Mausstämme keine Colitis. Sobald die Mäuse allerdings mit bestimmten Bakterien, die unter normalen Haltungsbedingungen in der kommensalen Mikroflora vorkommen, rekonstituiert wurden, entwickelten sie eine Colitis [48, 151]. Allerdings ist auch über die Mikroflora und ihre Zusammensetzung noch vieles unbekannt und muss in zukünftigen Studien geklärt werden [67].

CED werden vor allem in verschiedenen Maus-Colitismodellen zur Zeit erforscht, die allerdings nur bedingt bzw. in Teilaspekten auf den Menschen übertragbar sind. Das Dextran-Sodium-Sulfat (DSS-)-Modell z.B. löst eine chemisch bedingte Verletzung aus, die sekundär zur Entzündung der Darmmukosa führt [186].

1.2. Toll-like Rezeptoren (TLR)

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind eine Klasse von "*Pattern Recognition Receptors*" (PRRs), die konservierte pathogene Strukturen erkennen. Ursprünglich wurde das Toll-Protein in der Taufliege *Drosophila melanogaster* als essentielles Protein für die Entwicklung der embryonalen dorsoventralen Polarisierung entdeckt [9]. Später wurde die Bedeutung von Toll in der adulten Taufliege für die Immunantwort der Fliege bei Pilzinfektionen gezeigt [103]. Kurz darauf wurden Toll-Homologe in Säugetieren identifiziert, die Toll-like Rezeptoren [117, 147]. Im Menschen stellen TLRs ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar [117].

Bis heute wurden 13 Toll-Homologe in Säugetieren identifiziert. Im Menschen sind 10 TLRs und in der Maus 12 TLRs funktionell [17, 25, 89, 130]. TLRs sind Typ I-Integral-Membran-Proteine, die aus drei Domänen bestehen: einer großen, divergenten extrazellulären Domäne, die aus 19-25 Leucin-reichen Motiven ("*leucine rich repeats*" *LRR*) zur Ligandenbindung besteht, einer kurzen Transmembrandomäne und der hochkonservierten intrazellulären Toll-Interleukin-1 (IL-1)-Rezeptor-Domäne (TIR-

Domäne) für die Signaltransduktion [189]. Die TIR-Domäne ist essentiell für die Interaktion zwischen homo- und heterodimerisierten TLR-Untereinheiten und für die Rekrutierung zytoplasmatischer Adaptorproteine. Bislang wurden 5 Adaptormoleküle beschrieben: MyD88 (*"Myeloid differentiation primary response gene 88"*), Mal (*"MyD88 adaptor like"*), auch TIRAP (*"TIR domain containing adaptor protein"*) genannt, TRIF (*"TIR domain containing adaptor protein inducing Interferon- β "*), TRAM (*"TRIF related adaptor molecule"*) und der negative Regulator SARM (*"Sterile- α - and armadillo-motif-containing protein"*) [34, 54, 55, 76, 78, 87, 118, 128, 192, 193].

Jeder TLR hat seine spezifischen Liganden und damit eine eigene Aufgabe in der Erkennung pathogener Strukturen und der Einleitung der entsprechenden Immunantwort [25, 89, 130]. Als Homo- bzw. Heterodimere oder zusammen mit anderen Korezeptoren erkennen TLRs verschiedene mikrobielle Komponenten, wie z.B. Lipide, Lipoproteine, Proteine und Nukleinsäuren, die aus Bakterien, Viren und Pilzen stammen können [25, 89, 130].

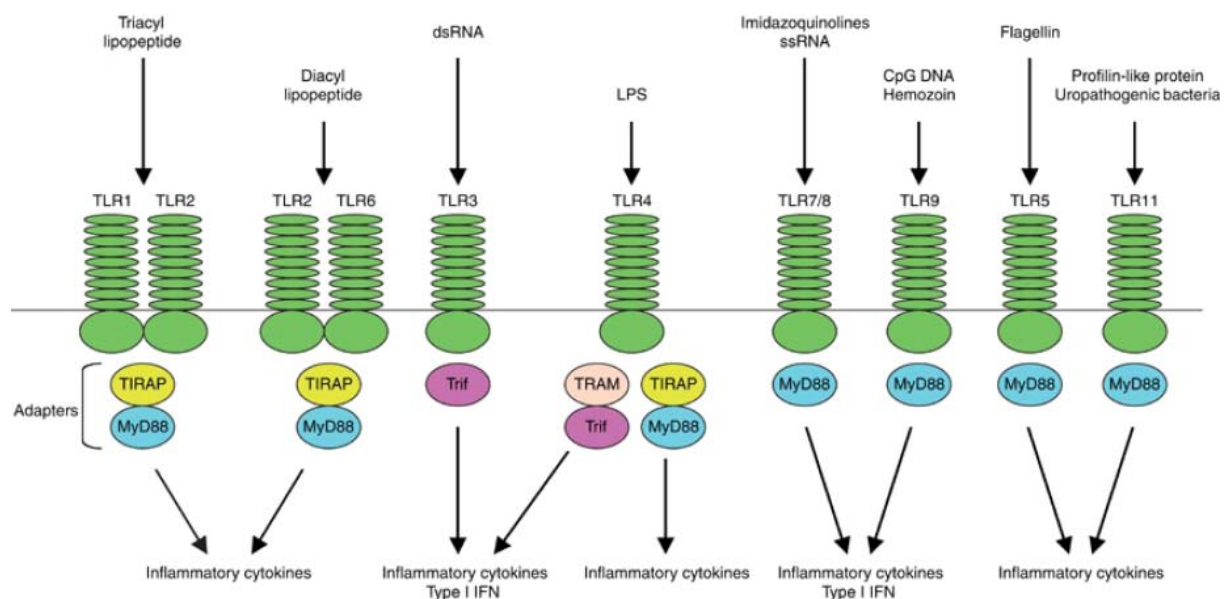


Abb.1.2. TLRs und ihre Liganden, entnommen aus [88]. TLR2 bildet mit TLR1 oder TLR6 Heterodimere und kann so zwischen di- und triacetylierten Lipopeptiden (*"Diacyl lipopeptide"*, *"Triacyl lipopeptide"*) unterscheiden. TLR3 bindet doppelsträngige RNA (*"dsRNA"*), während TLR4 LPS erkennt. Die Liganden der intrazellulären TLR7 und 8 sind Imidazoquinoline und einzelsträngige RNA (*"Imidazoquinolines"*, *"ssRNA"*) und von TLR9 virale DNA und parasitäre Produkte (*"CpG DNA"*, *"Hemozoin"*). TLR5 erkennt Flagellin und TLR11 profilin-ähnliche Proteine und uropathogene Bakterien (*"Profilin-like protein"*, *"Uropathogenic bacteria"*). Über die Adaptorproteine (*"adapters"*) führt die Ligandenbindung in der weiteren Signaltransduktion zur Bildung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (*"inflammatory cytokines"*) und Interferonen (*"Type I IFN"*).

TLRs werden auf vielen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems exprimiert sowie auch auf epithelialen und endothelialen Zellen im Darm [25]. Aufgrund ihrer zellulären Lokalisation lassen sich TLRs in zwei Gruppen einteilen. Während TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 an der Zelloberfläche lokalisiert sind und hauptsächlich mikrobielle Membranbestandteile wie Lipide, Lipoproteine und Proteine erkennen, befinden sich TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 an den Membranen intrazellulärer Kompartimente, wie des Endoplasmatischen Retikulums (ER), Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen. Diese intrazellulären TLRs erkennen bakterielle oder virale Nukleinsäuren [25, 89, 130].

TLR2 ist der TLR, der die größte Vielfalt an pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (*"pathogen-associated molecular patterns"*; PAMPs) erkennt. Diese umfassen u.a. bakterielle Lipopeptide, Peptidoglykane, Lipoteichonsäure aus gram-positiven Bakterien, Lipoarabinomannan aus Mykobakterien und Zymosan aus Pilzen [89]. Dieses breite Spektrum an PAMPs lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass TLR2 für eine erfolgreiche Ligandbindung und Signaltransduktion Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 bildet. Dabei erkennen die beiden Heterodimere unterschiedliche Lipopeptide. Das TLR2/TLR1-Heterodimer erkennt triacetylierte Lipopeptide aus gram-negativen Bakterien und Mykoplasmen [167], während das TLR2/TLR6-Heterodimer diacetylierte Lipopeptide aus gram-positiven Bakterien und Mykoplasmen bindet [166]. Ein Beispiel für ein triacetyliertes Lipopeptid ist der synthetisch hergestellte TLR2-Ligand Pam₃CySK4 (PCSK).

Für die Erkennung und Bindung seines spezifischen Liganden Lipopolysaccharid (LPS) benötigt TLR4 die drei Korezeptoren LBP (*"LPS-binding protein"*), CD14 und MD-2 (*"Myeloid differentiation factor-2"*). LBP ist ein Akut-Phase-Protein im Plasma und bindet zunächst LPS. Der LBP-LPS-Komplex lagert sich dann an den membrangebundenen oder auch löslichen CD14-Rezeptor an [17, 89, 130]. Die Bindung dieses LBP-LPS-CD14-Komplexes führt zur Assoziation mit dem TLR4/MD-2-Komplex auf der Zelloberfläche und zur Dimerisierung und Aktivierung von TLR4.

Die beiden TLR2-Heterodimere TLR2/TLR1 und TLR2/TLR6 benötigen nach der Ligandenbindung die Adaptormoleküle MyD88 und/oder Mal (TIRAP) für die Signaltransduktion in die Zelle [25, 89, 130]. TLR4 hingegen aktiviert sowohl den MyD88-abhängigen als auch den TRIF-abhängigen, MyD88-unabhängigen Signalweg. Im MyD88-abhängigen Signalweg rekrutiert MyD88 die Serin/Threonin-Kinasen der IRAK (*"Interleukin-1-receptor-associated-kinase"*)-Familie. Über die

Interaktion von IRAK mit TRAF6 (*"Tumor-Necrosis-Factor-associated factor 6"*) wird anschließend I κ B (*"Inhibitor κ B"*) degradiert und der Transkriptionsfaktor NF- κ B (*"Nuclear Factor- κ B"*) in den Zellkern transloziert. Gleichzeitig werden die MAPK (*"mitogen-activated protein kinase"*)-Kinasen Erk1 (*"extracellular signal-regulated kinase"1*), Erk2, p38 und Jnk (*"c-Jun N-terminal kinase"*) durch Phosphorylierung aktiviert, was wiederum andere Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (*"activator protein 1"*) und IP-10 (*"Interferon- γ -inducible Protein of 10kDa"*) aktiviert.

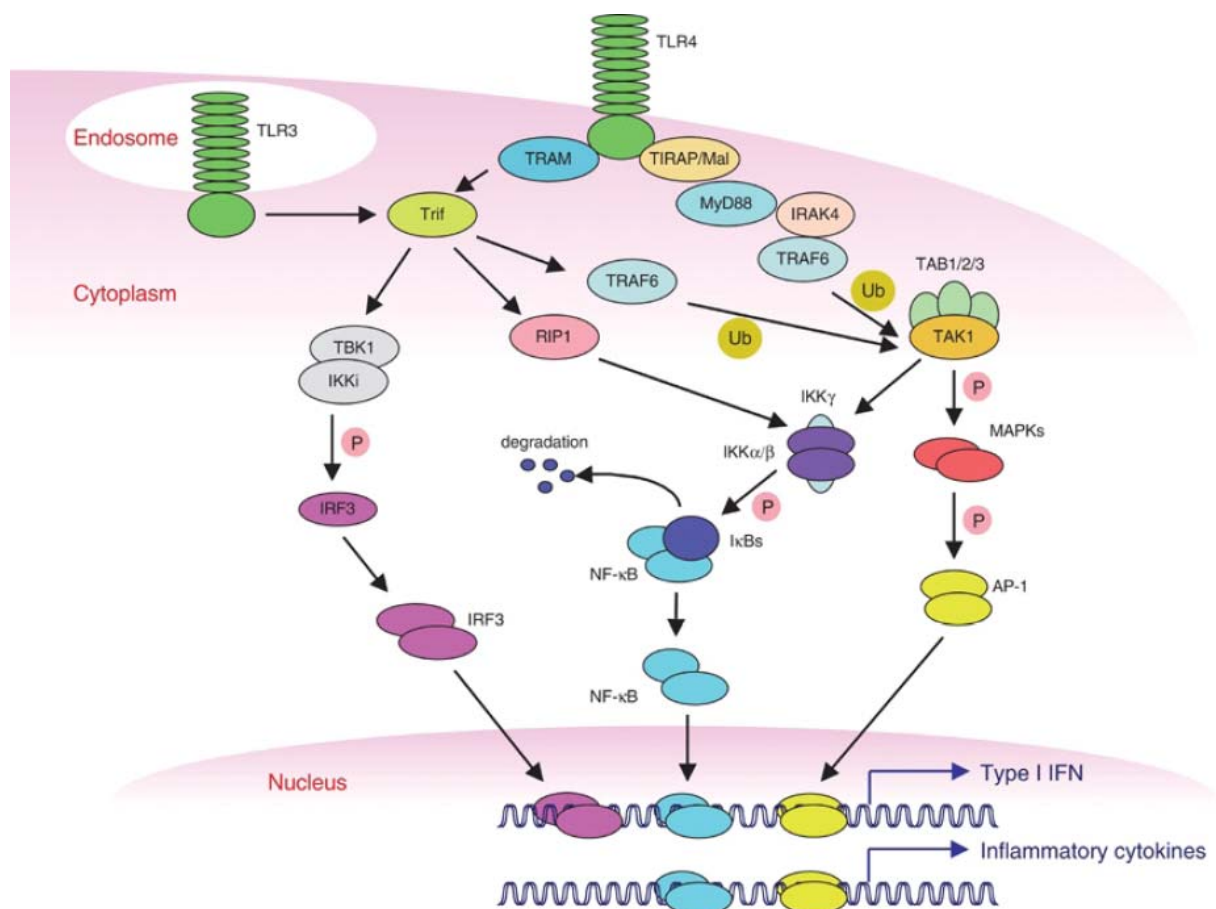


Abb.1.3. TLR-Signalweg, entnommen aus [88]. TLR4 aktiviert den MyD88-abhängigen und TRIF-abhängigen, MyD88-unabhängigen Signalweg, während TLR3 aus dem Endosom (*"Endosome"*) nur den TRIF-abhängigen Signalweg aktiviert. Im MyD88-abhängigen Signalweg rekrutiert MyD88 IRAK und über die Interaktion mit TRAF6 wird anschließend I κ B degradiert und der Transkriptionsfaktor NF- κ B aus dem Zytoplasma (*"Cytoplasm"*) in den Zellkern (*"Nucleus"*) transloziert. Gleichzeitig werden MAPKs durch Phosphorylierung aktiviert, was wiederum den Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert. Dies führt zur Transkription vieler Gene, die pro- und anti-inflammatorische Zytokine und Chemokine kodieren (*"Inflammatory cytokines"*). Die Aktivierung des TRIF-abhängigen Signalwegs führt über die Bildung eines großen Signalkomplexes mit vielen Proteinen zur Translokation des Transkriptionsfaktor IRF3, was zur Transkription von IFN- β und IFN-induzierten Genen führt (*"Type I Interferon"*).

Die Aktivierung des MyD88-abhängigen Signalwegs führt zur Transkription vieler Gene, die pro- und anti-inflammatorische Zytokine und Chemokine kodieren und zur Induktion kostimulatorischer Moleküle. Diese sind z.B. TNF α ("*Tumor Necrosis Factor α* "), IL-1 β ("*Interleukin-1 β* "), IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12. Die Aktivierung des TRIF-abhängigen Signalwegs führt über die Bildung eines großen Signalkomplexes mit vielen Proteinen zur Aktivierung des NF- κ B- und auch MAPK-Signalwegs. Zusätzlich wird der Transkriptionsfaktor IRF3 ("*Interferon-regulatory factor 3*") aktiviert, was zur Transkription von IFN- β ("*Interferon- β* ") und IFN-induzierten Genen führt [25, 89, 130].

1.2.1. TLR-Polymorphismen

Genetische Mutationen in PRRs können die Reaktion des Immunsystems auf pathogene Keime und im Gastrointestinaltrakt auch auf die kommensale Mikroflora verändern. Diese Variationen können zum Beispiel in Form eines Einzel-Basen-Austausches oder Substitution, im Englischen ein sog. "*Single Nucleotide Polymorphism*" (SNP) vorliegen. Solche inter-individuellen Variationen treten in ca. 0,1% des menschlichen Genoms (ca. 3 Millionen Nukleotide) auf und haben in den meisten Fällen keine direkten Auswirkungen. SNPs stellen ca. 90% der genetischen Varianten im humanen Genom dar und haben eine Frequenz von über 1% in der Bevölkerung. Dabei ist ihre Verteilung nicht gleichmäßig, sondern meist populationsabhängig [2].

In den letzten Jahren wurden in TLRs Polymorphismen identifiziert, die die zelluläre Immunantwort und Zytokinproduktion *in vitro* verändern. Zusätzlich geben genetische Studien Hinweise darauf, dass bestimmte TLR-Polymorphismen mit der Suszeptibilität für diverse Immunerkrankungen assoziiert sind. Allerdings ist keiner dieser TLR-Polymorphismen in den kürzlich veröffentlichten GWAS zu CED gefunden worden [31]. Dies hängt wahrscheinlich mit dem Design der GWAS zusammen, da in diesen Studien die untersuchte Population nicht weiter unterteilt wird. Würde man in diesen Studien weitere Subgruppierungen des Patientenkollektivs vornehmen, so könnten möglicherweise weitere Assoziationen identifiziert werden.

Für TLR2 wird vor allem ein Polymorphismus beschrieben, der TLR2-R753Q-Polymorphismus. Im mutierten TLR2-R753Q findet an der Aminosäureposition 753

eine Transition von Arginin zu Glutamin durch den SNP statt [106]. Die Aminosäure 753 liegt in der extrazellulären Domäne von TLR2, die exakten Auswirkungen des Aminosäureaustausches auf die Struktur und Signaltransduktion des Rezeptors sind allerdings noch nicht bekannt. Bislang fehlt die Kristallstruktur des TLR2-R753Q-Proteins, es wird aber vermutet, dass die Tertiärstruktur des Rezeptors gestört ist und die Ligandenbindung beeinträchtigt ist [106]. In der westlich-kaukasischen Bevölkerung sind ca. 3-10% heterozygot für den TLR2-R753Q-Polymorphismus [106, 154]. Vor Kurzem wurde die R753Q-Variante des TLR2-Gens mit einem besonders schweren Phänotyp der Colitis ulcerosa, der sog. Pancolitis, in einer belgischen Studie assoziiert [134]. Die molekularen und funktionellen Mechanismen, die zur Ausprägung dieses Phänotyps durch die TLR2-R753Q-Mutation führen, sind noch gänzlich unbekannt. Als ein weiterer Polymorphismus wurde der TLR1-R80T-Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko für Colitis ulcerosa assoziiert [134], wobei auch hier die molekularen Mechanismen unbekannt sind.

Auch für TLR4 sind genetische Variationen beschrieben worden, der TLR4-D299G- und der TLR4-T399I-Polymorphismus. Beim TLR4-D299G-SNP wird an der Aminosäureposition 299 Asparaginsäure in Glycin ausgetauscht und beim TLR4-T399I-SNP Threonin in Isoleucin an Position 399. In der europäisch-kaukasischen Bevölkerung liegen beide TLR4-Varianten mit einer Frequenz von ca. 6-10% vor [90]. Beide Polymorphismen liegen in der extrazellulären Domäne des Rezeptors und könnten so möglicherweise zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führen [143]. Dementsprechend könnte auch hier die Bindungsaffinität von Liganden oder Korezeptoren niedriger sein [143]. *In-vitro*-Daten deuten darauf hin, dass die TLR4-D299G-Mutation die Rezeptorfunktion nach LPS-Stimulation hemmt [11]. Dabei scheint allerdings der LPS-Serotyp eine entscheidende Rolle zu spielen. In einer Studie mit humanen, primären mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) mit der TLR4-D299G-Mutation konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit *Salmonella-typhimurium*-LPS die Produktion von IL-12p70 induziert wurde und I κ B α in geringen Mengen phosphoryliert wurde. Im Gegensatz dazu zeigte die Stimulation mit *Escherichia-coli*-LPS in PBMC mit der TLR4-D299G-Mutation keinen Effekt [108].

Das TLR4-Gen ist auf Chromosom 9 (q32-33) lokalisiert [147], einer Region, in der auch Sukzeptibilitätsloci für Morbus Crohn gefunden wurden [37]. Der TLR4-D299G-Polymorphismus konnte dementsprechend in verschiedenen Studien sowohl mit

Morbus Crohn als auch mit Colitis ulcerosa assoziiert werden [20, 43, 57] - der TLR4-T399I-Polymorphismus dagegen nur in vereinzelt Populationen [157]. Auch bei diesen beiden Polymorphismen sind die molekularen Mechanismen und funktionellen Effekte in der intestinalen Mukosa und bei CED bisher nicht geklärt.

1.3. Das mukosale Immunsystem

Das Immunsystem lässt sich in verschiedene Kompartimente aufteilen, die jeweils an die Antigene, die in einem bestimmten Gewebe vorliegen, angepasst sind. Das mukosale Immunsystem bildet den größten Teil der Immungewebe im menschlichen Körper und umfasst $\frac{3}{4}$ aller Lymphozyten. Zum mukosalen Immunsystem gehören der Gastrointestinaltrakt, die oberen und unteren Atemwege, sowie der Urogenitaltrakt und die exokrinen Drüsen, wie das Pankreas, die Bindehaut, die Tränendrüsen der Augen, die Speicheldrüsen und die Milchdrüsen der Brust [109, 123]. Aufgrund ihrer physiologischen Funktionen sind die Schleimhautoberflächen des Gastrointestinaltraktes permeable Barrieren zum Inneren des Körpers und müssen deshalb wirksame Abwehrmechanismen, die vor einer Invasion von Pathogenen schützen, besitzen. Hierbei ist allerdings ein großer Teil der eindringenden Fremdartigene nicht pathogen, so dass diese Barriere zusätzlich zwischen schädlichen Krankheitserregern und kommensalen Bakterien oder auch Antigenen z.B. aus der Nahrung unterscheiden muss. Die kommensale Mikroflora des Dickdarms umfasst mindestens 1000 Spezies von Mikroorganismen, so dass dort eine Dichte von 10^{12} Organismen pro Milliliter vorherrscht [123].

Das mukosale Immunsystem kommt im Vergleich zum systemischen Immunsystem in den anderen Bereichen des Körpers wesentlich häufiger in Kontakt mit Antigenen und hat deshalb besondere Eigenschaften. In den Schleimhäuten sind selbst ohne Infektion zahlreiche aktivierte Zellen, wie unspezifisch aktivierte Effektorzellen und regulatorische Zellen und Gedächtniszellen, zu finden [109, 123]. Durch aktives Blockieren von Immunantworten wird eine immunregulatorische Umgebung von inhibitorischen Makrophagen und toleranzauslösenden dendritischen Zellen aufrechterhalten.

Das größte Kompartiment des mukosalen Immunsystems ist das darmassoziierte lymphatische Gewebe ("*gut associated lymphoid tissue*" GALT). Die Schleimhaut des Darms besteht aus Villi und Krypten, die von einer dünnen Epithelschicht bedeckt

sind. Unter dem Epithel liegt eine Schicht aus Bindegewebe, die Lamina Propria. Immunzellen wie Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen kommen im gesamten Darmtrakt vor, entweder in den organisierten Geweben (GALT) oder verstreut über das Epithel und in der Lamina Propria. Diese Effektorzellen kommen auch im gesunden Darmgewebe in einer großen Anzahl vor [109, 123]. Dabei unterscheiden sich das Epithel und die darunter liegende Lamina Propria deutlich in der Zusammensetzung der Zellen. Das Epithel enthält neben den vier Arten von Epithelzellen vor allem Lymphozyten, die als intraepitheliale Zellen bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu ist die Lamina Propria viel heterogener mit Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und wenigen eosinophilen Zellen und Mastzellen. Neutrophile Granulozyten sind im gesunden Darm selten, bei Entzündungen oder Infektionen nimmt ihre Zahl allerdings schnell zu [109, 123].

Die gesunde Darmschleimhaut zeigt also viele Merkmale einer unterschwellig chronischen Entzündung, die klinisch keine erkennbaren Symptome auslöst. Dies lässt darauf schließen, dass es strenge regulatorische und Toleranz-Mechanismen gibt, die im gesunden Darm verhindern, dass lokale Immunreaktionen außer Kontrolle geraten [109].

1.4. Das intestinale Epithel

Das intestinale Epithel bildet als mechanische und auch immunologische Barriere die Frontlinie des mukosalen Immunsystems. Dabei bildet es eine Schutzbarriere zwischen Mikroben und zahlreichen Substanzen des Darmlumens, wie Nahrungsantigenen und Verdauungsenzymen, und den Effektorzellen des Immunsystems in der Lamina Propria und deren Produkten, wie Zytokinen, Wachstums- und Gerinnungsfaktoren [172]. Gleichzeitig ist das Darmepithel allerdings auch für die Resorption hydrolysierter Nährstoffe verantwortlich. Dies zeigt das komplexe Aufgabengebiet der intestinalen Epithelzellen (IEC). Einerseits müssen IEC pathogene Keime erkennen, ausschließen und beseitigen, andererseits müssen sie Nährstoffe und ungefährliche Bakterien der kommensalen Mikroflora durchlassen, ohne eine Immunantwort gegen diese zu initiieren [25, 172].

Für die effiziente Ausübung der Immunantworten gegen pathogene Substanzen ist die Aufrechterhaltung der mechanischen Intaktheit der Epithelbarriere von

entscheidender Bedeutung. Innerhalb von 48-96 Stunden kommt es unter physiologischen Bedingungen zu einer vollständigen Erneuerung des Darmepithels. Dies ist von entscheidender Bedeutung für eine effiziente Regenerierung des Epithels nach Verletzungen [135, 137].

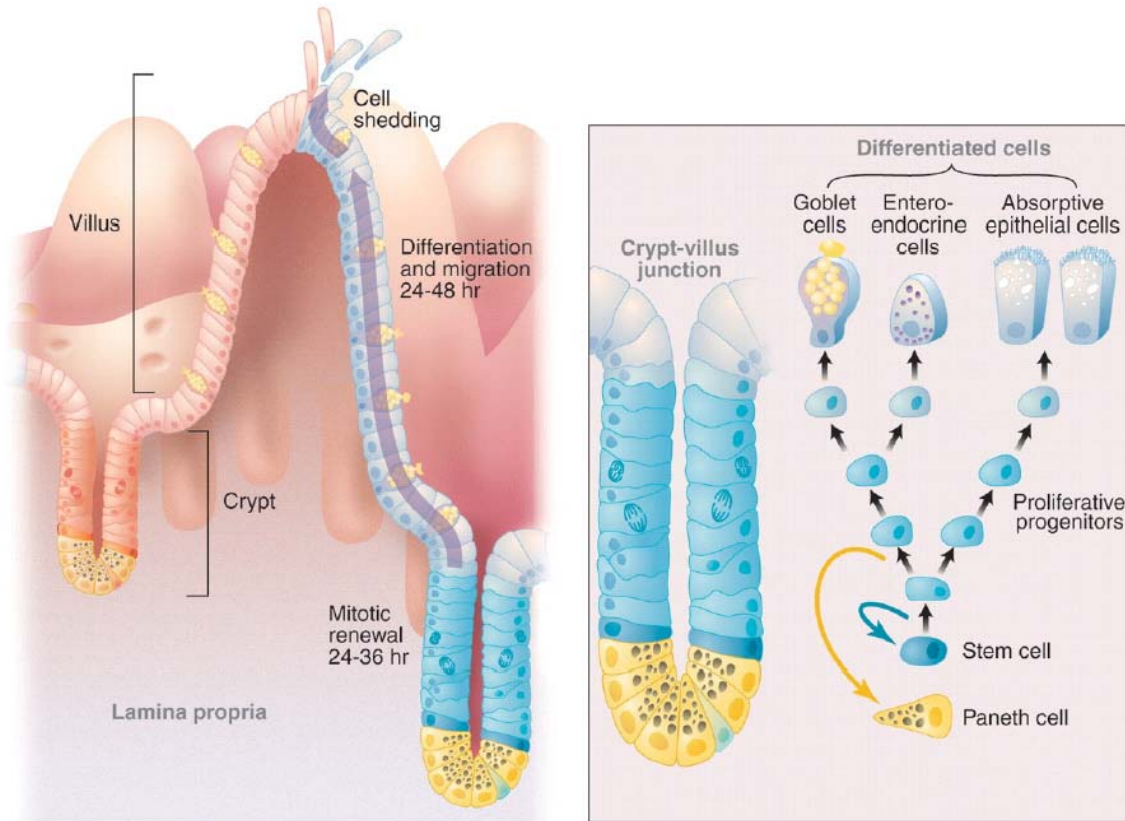


Abb.1.4. Aufbau des intestinalen Epithels, entnommen aus [140]. Das intestinale Epithel besteht aus Villi ("Villus") und Krypten ("Crypt"). In den Krypten sitzen unreife, undifferenzierte Stammzellen ("stem cell"), die eine hohe Mitosekapazität ("Mitotic renewal") besitzen. Nach Teilung der Stammzelle differenziert die Tochterzelle auf der Wanderung in die Spitze des Villus schrittweise über verschiedene Vorläuferzellen ("proliferative progenitor") zu einem der 4 verschiedenen Zelltypen des Darmepithels, den Becherzellen ("Goblet cells"), enteroendokrinen Zellen ("Enteroendocrine cells"), Enterozyten ("Absorptive epithelial cells") oder Paneth-Körnerzellen ("Paneth cells") aus. An der Villusspitze kommt es dann zur Apoptose und Ablösung der Zellen ("Cell shedding").

Die Epitheloberfläche bildet mit den sogenannten Villi Ausstülpungen, deren tiefe Zwischenräume Krypten genannt werden. In diesen Krypten sitzen unreife, undifferenzierte Stammzellen, die eine hohe Mitosekapazität besitzen [144]. Nach Teilung der Stammzelle differenziert die Tochterzelle auf der Wanderung in die Spitze der Villi schrittweise zu einem der 4 verschiedenen Zelltypen des Darmepithels aus. Diese sind Enterozyten, Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Paneth-Körnerzellen. Neben den Stammzellen zur Zellerneuerung befinden sich in den Krypten auch Paneth-Körnerzellen. Diese sekretieren vor allem Lysozyme, die

Bakterien lysieren können und Defensine, die antibakteriell wirken [155]. Die Villi bestehen hauptsächlich aus Enterozyten. Zwischen den Enterozyten liegen Becherzellen, die durch Exozytose Mucine ausschütten können [111]. Dieser Mucus kann Bakterien einhüllen und so eine Interaktion der Bakterien mit den Epithelzellen und eine Infektion verhindern. Enteroendokrine Zellen machen nur etwa 1% der Zellen in den Krypten und Villi aus. Zusätzlich sind im Epithel M-Zellen (Mikrofolten der lumenalen Oberfläche) lokalisiert, die Antigene aufnehmen und so Immunantworten initiieren können.

Differenzierte Enterozyten tragen auf ihrer apikalen Oberfläche sogenannte Mikrovilli, um die Fläche für die Resorption der Nährstoffe zu vergrößern. Dementsprechend wird der apikale Bereich auch als "Bürstensaum" bezeichnet. Dieser "Bürstensaum" ist mit einer Schicht aus Glykoproteinen und Glykolipiden zur Abwehr von Eindringlingen überzogen [112]. Einen zusätzlichen unspezifischen Abwehrmechanismus bilden Ektoenzyme, Transmembranproteine in der Membran der Mikrovilli, wie z.B. die Hydrolasen Sucrase-Isomaltase, Neutrale Aminopeptidase und Alkalische Phosphatase. Deren extrazelluläre Domänen katalysieren die Spaltung von Oligosacchariden und Oligopeptiden an der Mikrovillimembran [73].

Die Barrierefunktion des einschichtigen Epithels wird durch Zell-Zell-Verbindungen und auch durch die Zellpolarität ausdifferenzierter IEC gebildet und aufrechterhalten. Dabei liegen im Epithel drei Arten von Zell-Zell-Kontakten vor: undurchlässige Verbindungen wie "*tight junctions*" [111], Haft- und Ankerverbindungen (Adhäsionskontakte und Desmosomen) [194] und Verbindungen zur Zell-Zell-Kommunikation, sog. "*gap junctions*" [98]. Die Zell-Zell-Kommunikation über "*gap junctions*" ist dabei ein essentieller Mechanismus zur Regulation von Zellproliferation, Migration und Differenzierung [98]. Die Differenzierung der IEC führt ihrerseits zur Bildung einer klaren Zellpolarität, die zum gerichteten Transport oder Membraneinbau verschiedener Moleküle, wie von Rezeptoren, führt.

Schon seit mehreren Jahren ist bekannt, dass Epithelzellen neben der rein mechanischen Schutzfunktion und unspezifischen Abwehrmechanismen eine zentrale Rolle in der Initiation der adaptiven Immunantwort spielen. IEC exprimieren neben MHC-I-Molekülen ("*Major histocompatibility complex*" – Haupt-histokompatibilitätskomplex, HLA), die auf nahezu allen Körperzellen exprimiert sind, auch MHC-II-Moleküle, die sonst ausschließlich auf professionellen

antigenpräsentierenden Zellen exprimiert sind [75]. Somit können IEC eine gezielte, spezifische Immunantwort durch die Aktivierung von Effektorvorläuferzellen initiieren. Eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der angeborenen Immunantwort und der intestinalen mukosalen Zellhomöostase spielen die PRRs. TLRs und "*Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Receptors*" (NLRs) erkennen Mikroben und endogene "*Danger*"-Signale, verhindern die Invasion von Pathogenen und anderen gefährlichen Substanzen, induzieren antimikrobielle Signalwege und kontrollieren adaptive Immunantworten [25]. Verdeutlicht wird dies dadurch, dass im DSS-Colitis-Mausmodell TLR2-, TLR3-, TLR4-, TLR5-, TLR9- oder MyD88-defiziente Mäuse eine verspätete oder stark verminderte Wundheilung des verletzten Gewebes zeigten [28, 59, 141, 179]. TLRs sind konstitutiv oder induzierbar in vielen Zelltypen des humanen Gastrointestinaltrakts exprimiert, darunter auch in den 4 Epithelzelltypen [4, 21, 22, 65, 127, 129, 149, 159, 177]. Das Expressionsmuster der verschiedenen TLRs unterscheidet sich je nach Zelltyp und kann auch für einen bestimmten Zelltyp je nach Lokalisation der Zelle variieren.

Ausdifferenzierte IEC exprimieren TLR2 und TLR4 hauptsächlich am apikalen Pol, um das lumenale Milieu zu überwachen [23]. Im gesunden Darm werden TLR2 und TLR4 allerdings nur in geringen Mengen auf IEC und mononukleären Zellen der Lamina Propria exprimiert, um keine Immunantwort auf die kommensale Mikroflora auszulösen, aber trotzdem einen basalen Aktivierungszustand aufrechtzuerhalten [4, 21, 74, 127, 129, 159]. Die Aktivierung von TLRs durch die kommensale Mikroflora wird zusätzlich durch zelluläre Mechanismen wie Kompartimentalisierung, differenzielle Aktivierung oder auch durch verschiedene negative Regulatoren unterdrückt [26]. Im Falle einer Infektion oder Verletzung können diese Regulationsmechanismen aufgehoben werden, so dass TLRs sofort eine Immunantwort initiieren können. Eine anhaltende TLR-Hyperaktivierung könnte in CED eine chronische Entzündung oder einen neuen Schub auslösen. Sowohl in aktiver als auch inaktiver CED ist TLR4 in primären IEC und mononukleären Zellen der Lamina Propria signifikant erhöht [21, 74]. Es ist allerdings noch unklar, ob diese Hochregulation durch sekundäre Effekte proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und TNF- α verursacht wird [5, 164]. Dies könnte einen abweichenden Aktivierungszustand von TLRs in CED repräsentieren.

Neben der Einleitung einer adaptiven Immunantwort spielen TLRs auch eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des intestinalen Epithels. TLR2 ist bislang

der einzige identifizierte PRR, der direkt den transepithelialen Widerstand der Epithelbarriere verstärken kann [24]. *In vitro* konnte die Stimulation von TLR2 bei einer stress-induzierten Verletzung die "*tight junction*"-assoziierte Integrität des Epithels über Proteinkinase C (PKC) α/δ erhalten. *In vivo* zeigten TLR2-defiziente Mäuse im DSS-Colitismodell früh einen kompletten Verlust der "*tight junction*"-Integrität der intestinalen Barriere, TLR2-exprimierende Mäuse jedoch nicht. In TLR2-exprimierenden Mäusen führte die Therapie mit dem spezifischen TLR2-Liganden PCSK zum Schutz der Epithelintegrität und verminderte so die Durchlässigkeit des Epithels bei Colitis. Dadurch wurden die weiteren klinischen Zeichen deutlich abgemildert und die Mäuse erholten sich schneller [28].

Zusammenfassend spielen TLRs eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der intestinalen Epithelbarriere und Zellhomöostase durch die Verstärkung der Barriereintegrität, Inhibierung von Apoptose, Förderung der Wundheilung und Gewebeerneuerung, Induktion anderer mikrobieller Abwehrmechanismen bei Toleranz gegenüber kommensalen Bakterien und Initiierung adaptiver Immunantworten [32].

1.4.1. Caco-2-Zellen als Zellkulturmodell der intestinalen Epithelzellen

Die Caco-2-Zelllinie (ATCC Nummer HTB-37TM) wurde aus dem Colonepithel eines Adenomkarzinom-Patienten kaukasischer Rasse isoliert [1] und bildet ein Standardzellkulturmodell für intestinale Epithelzellen. Humane Caco-2-Zellen sind immortal und wachsen in Kultur adhärent, wobei sie spontan ausdifferenzieren. Sie repräsentieren klar polarisierte Zellen mit einem gut ausgebildeten Bürstensaum, entsprechenden Enzymen (Hydrolasen wie Sucrase-Isomaltase, Neutrale Amino-peptidase und Alkalische Phosphatase) und Zell-Zell-Kontakten über "*tight junctions*" und "*gap junctions*" [156]. Caco-2-Zellen bilden zwar Mucus, aber keine geschlossene Mucusschicht, so dass Pharmazeutika und andere Substanzen von den Zellen absorbiert werden können. Dies macht sie zu einem interessanten Modellsystem zur Untersuchung von Arzneistofftransportprozessen [184], die auch *in vivo* im intestinalen Epithel ablaufen. So wurde ein Absorptionsmodell entwickelt, das eine schnelle und effiziente Ausdifferenzierung von Caco-2-Zellen auf Polyethylen Terephthalat (PET)-Membranen erlaubt [38]. Die ausdifferenzierten Zellen bilden polarisierte, säulenförmige Zellen mit Mikrovilli und "*tight junctions*" auf der apikalen

Seite und können so z.B. für Permeabilitäts- und Absorptionsstudien neuer Pharmazeutika im großen Maßstab eingesetzt werden [12].

Stabil mit dem Onkogen c-Ha-Ras transfizierte Caco-2-Zellen können für Tumoruntersuchungen in einem CD1 *nu/nu* Xenograft-Mausmodell auf Matrigel®-Basis genutzt werden [42]. Untransfizierte Caco-2-Zellen zeigten in diesem Xenograft-Modell jedoch kein Tumorpotential [42].

1.5. Colitis-assoziiertes Colonkarzinom

Weltweit erkranken jedes Jahr über 1 Million Menschen an Darmkrebs. Risikofaktoren hierfür sind unter anderem Umweltmutagene, Ernährung, spezielle kommensale und pathogene Bakterien und CED [170, 171]. Chronische Entzündungen sind schon vor längerer Zeit mit der Entstehung von Tumoren assoziiert worden. Durch die chronischen Verletzungen der Darmmukosa haben CED-Patienten ein erhöhtes Risiko, ein sogenanntes Colitis-assoziiertes Colonkarzinom zu entwickeln. Das Risiko korreliert positiv mit der Krankheitsdauer, Ausdehnung der entzündeten Stellen und dem Schweregrad der Entzündung [80]. Bei einer CED-Dauer von ungefähr 30 Jahren entwickeln mehr als 20% der Patienten ein Colitis-assoziiertes Colonkarzinom, an dem mehr als 50% sterben [99].

Colitis-assoziierte Colonkarzinome enthalten dichte Infiltrate von Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen [181], aber die exakten zellulären und molekularen Mechanismen, die zur Tumorentstehung und –progression führen, sind noch weitestgehend ungeklärt. Obwohl bestimmte Immunreaktionen in der Entstehung eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms auch in der Tumorentstehung eines sporadischen, entzündungsunabhängigen Colonkarzinoms involviert sind, wird davon ausgegangen, dass unterschiedliche Entstehungsprozesse in diesen beiden Darmkrebsarten bestehen. Die Bildung wohldefinierter Adenome, die für das sporadische Colonkarzinom beschrieben wurde, wird für das Colitis-assoziierte Colonkarzinom hingegen nicht vermutet [171]. Allerdings wurden auch karzinogene Signalwege wie Chromosomeninstabilität, Mikrosatelliteninstabilität und Hypermethylierung, die zu einem sporadischen Colonkarzinom führen, in der Tumorgenese des Colitis-assoziierten Colonkarzinoms beschrieben [81]. Im Gegensatz zu gesunder Darmmukosa konnten in der Mukosa von CED-Patienten

diese Veränderungen nachgewiesen werden, ohne vorherige histologische Hinweise auf eine maligne Entartung der Zellen.

Die chronische Entzündung führt bei der Tumorentstehung des Colitis-assoziierten Colonkarzinoms wahrscheinlich zusätzlich zur Ausschüttung vieler Wachstums- und Überlebensfaktoren durch rekrutierte Entzündungszellen. Diese fördern dann das Wachstum von Zellen mit einer DNA-Schädigung oder Mutation, aus denen der Tumor entsteht [83, 104]. In der weiteren Tumorprogression sind in der Umgebung des Tumors häufig vermehrt Effektor-T-Zellen zu finden, die allerdings nicht für den Tumor, sondern für die kommensale Mikroflora spezifisch sind. Diese T-Zellen sind folglich nicht dazu in der Lage, die Tumorzellen abzutöten, sondern fördern durch ihre Zytokinproduktion vielmehr das Tumorwachstum [182].

Die kommensale Mikroflora und ihre Zusammensetzung scheint eine zusätzliche wichtige Rolle in der Entstehung eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms zu spielen [175]. Im AOM-Mausmodell (Azoxymethan) bei IL-10-defizienten Mäusen mit Spontancolitis moduliert die Veränderung der Mikroflora die Tumorgenese eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms, wobei auch der TLR/MyD88-Signalweg essentiell involviert zu sein scheint [176]. Des Weiteren können kommensale Bakterien die Tumorentstehung durch gesteigerte und abweichende T-Zell-Antworten während einer Colitis triggern [187] oder aber PRRs wie TLRs abweichend aktivieren.

Vor kurzem konnte in einigen Studien die Mitwirkung des TLR4-Signalweges über NF- κ B an der Tumorprogression des Colitis-assoziierten Colonkarzinoms gezeigt werden. NF- κ B kann sowohl tumorfördernd als auch tumorinhibierend wirken, wobei durch eine abweichende TLR4-Signalkaskade wahrscheinlich die tumorfördernden Eigenschaften von NF- κ B aktiviert werden [114]. TLRs sind in IEC für die Rekrutierung und Aktivierung von Cyclooxygenase-2 (COX-2)-exprimierenden Makrophagen verantwortlich, die über Prostaglandin 2 (PGE₂) das Tumorwachstum im AOM/DSS-Modell fördern [62]. In diesem chemisch-induziertem Tumormodell waren TLR4-defiziente Mäuse durch den Mangel an PGE₂ vor Darmtumoren geschützt [61], während Mäuse, die für den negativen TLR4-Regulator SIGIRR (*"Single immunoglobulin IL-1R-related molecule"*) defizient waren, eine gesteigerte Empfänglichkeit für Colonkarzinome zeigten [64]. In einem weiteren Mausmodell, dem Apc^{Min}-Modell, konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass MyD88-defiziente Mäuse signifikant weniger Tumore bildeten, die außerdem deutlich kleiner waren

[142]. Zusätzlich sind wahrscheinlich noch viele weitere Signalwege und Moleküle der Entzündungsantwort in die Entstehung eines Colits-assoziierten Colonkarzinoms eingebunden. Vor kurzem konnte z.B. die NF- κ B-IL-6-STAT3-Signalkaskade (*STAT3* - "*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*") als ein wichtiger Regulator für Proliferation und Überleben von tumor-initiierenden IEC identifiziert werden [68]. Weiterhin ist auch noch nicht geklärt, wie die Dysfunktion der angeborenen Immunität über die Beeinträchtigung der Krebsstammzell-Differenzierung und über die Wnt-APC- β -Catenin-Kaskade (*Wnt* - "*Wingless/int*") zur Entstehung eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms beiträgt [13].

Es ist bisher nicht untersucht, ob Polymorphismen in TLRs und damit verbundene Fehlaktivierungen der TLRs zur Tumorentstehung im Colon führen, vor allem im Kontext einer humanen CED.

1.6. Zielsetzung

Da die Ätio-Pathogenese von CED noch nicht eindeutig geklärt ist, ist die Erforschung der Mechanismen, die CED verursachen oder triggern können, wichtig. TLRs spielen eine Schlüsselrolle in der mukosalen Immunität. Während einer CED-Colitis ist die TLR2-/TLR4-Proteinexpression in IEC signifikant alteriert.

Der TLR2-R753Q-Polymorphismus ist mit einem besonders schweren Krankheitsphänotyp, der sog. Pancolitis, in einer belgischen Studie von Colitis ulcerosa-Patienten assoziiert worden. Die TLR4-Variante TLR4-D299G wurde in mehreren Studien mit einer erhöhten Sukzeptibilität für CED assoziiert, wobei der TLR4-T399I-Polymorphismus hingegen nur in vereinzelt Studien mit CED in Zusammenhang gebracht wurde. Sowohl für die Colitis ulcerosa-assoziierte TLR2-R753Q-Mutation als auch für die beiden CED-assoziierten TLR4-Mutationen sind die Auswirkungen im intestinalen Epithel ungeklärt.

Deshalb sollten in dieser Arbeit anhand einer Transfektionsstudie mit der humanen intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 die molekular- und zellbiologischen Effekte der TLR-Polymorphismen TLR2-R753Q, TLR4-D299G und TLR4-T399I in IEC untersucht werden. Für den TLR2-R753Q-Polymorphismus sollte der Schwerpunkt der Untersuchungen auf Wundheilungsmechanismen gelegt werden. Besondere Bedeutung fanden dabei Analysen der Differenzierung, Barrierefunktion und Restitution. Diese sollten mit der Messung des transepithelialen Widerstandes, der

Proliferation und der metabolischen Aktivität, Expressionsuntersuchungen von Genen der Zell-Zell-Kommunikation und Barriereintegrität, und funktionellen Studien zur Wundheilung und Restitution näher charakterisiert werden. Bei den TLR4-Polymorphismen sollten vor allem entzündungs- und tumorfördernde Mechanismen untersucht werden. Hierzu sollten die verschiedenen Zellklone zunächst morphologisch und in ihrer Zellteilung charakterisiert werden. Des Weiteren sollten die Proliferation, metabolische Aktivität und die Genexpression verschiedener entzündungsassoziierter Gene analysiert werden. Das Tumorpotential der Zellen sollte *in vitro* in einem Matrigel®-Invasionsversuch und *in vivo* im CD1 *nu/nu* Xenograft-Mausmodell getestet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien, Chemikalien und Geräte

2.1.1. Materialien

1ml Spritzen*	Terumo, Leuven, Belgien
Deckgläser	Engelbrecht Medizin- und Labor- Technik GmbH, Edermünde
Deckgläser, geschliffen (kontrollierte Dicke $0,17 \pm 0,01\text{mm}$)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co Kg, Sondheim
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5ml und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben (500ml)	Schott, Mainz
Filme Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Filme Kodak BioMax Light	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Frischhaltefolie Saran	Dow, Schwalbach/Ts.
Gelkammern Horizon® 58	Life Technologies, Darmstadt
Kanülen 27G x $\frac{3}{4}$ " Nr. 20*	BD Biosciences, Heidelberg
Kryogefäß (2ml)*	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Matrigel® Zellkultureinsätze (8µm)*	BD Biocoat, Heidelberg
Mediumkonzentriersäulen Amicon Ultra-4	Millipore, Eschborn
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
NuPAGE 4-12% Bis-Tris SDS Page Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger SUPERFROST® PLUS GOLD	Thermo Scientific, Schwerte
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR Reaktionsgefäße (0,5ml)	Roth, Karlsruhe
Petrischalen*	BD Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen Filter Tips*	
0,1 – 10µl	
1 – 100µl	
101 – 1000µl	StarLab, Ahrensburg

Poly-D-Lysin-Flachbodenplatte (6, 12, 24 Wells)*	BD Biocoat, Heidelberg
Poly-D-Lysin-Kulturflasche (T25 und T75)*	BD Biocoat, Heidelberg
PVDF-Membran Immobilon-P Porengröße 0,45µm	Millipore, Eschborn
Rasierklinge (autoklaviert)	Apollo, Solingen
Realtime Filterpipettenspitzen*	
0,1 – 10µl	
0,5 – 10µl	
2 – 100µl	
50 – 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Röntgen-Entwicklerkassette mit Verstärkerfolie	Rego, Augsburg
Rundbodenröhrchen (10ml)*	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Schwämme (Blotting Pads)	Invitrogen, Karlsruhe
Wattestäbchen	Maimed GmbH&Co.Kg, Neuenkirchen
Whatman Papier Dicke 3MM CHR	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkultureinsätze (0,4µm Porengröße)*	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturflasche (T25 und T75)*	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturpipetten*	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6 und 96 Wells)*	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifugengefäße (15ml und 50ml)*	Greiner Bio-one, Frickenhausen

mit * markierte Materialien sind steril

2.1.2. Chemische Substanzen

Agarose (Ultrapure)	Invitrogen, Karlsruhe
Aqua dest. Ecotainer	Braun Melsungen AG, Melsungen
Azeton	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Blastizidin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Blastizidin Agar	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Blastizidin LB-Medium	InvivoGen, Toulouse, Frankreich

Bio Rad Protein-Assay	Bio-Rad, München
Bromochloropropan (BCP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Pulver)	PAA, Pasching, Österreich
CitraMount™ Deckelmedium	Polysciences Inc., Warrington, USA
COX-2 Inhibitor II SC-791	Calbiochem, Darmstadt
DAPI Eindeckmedium Vectashield	Vektor, Lörrach
DMSO (Dimethylsulfoxid < 0,1% C ₂ H ₆ O ₅)	WAK-Chemie, Dessau
dNTP Mix	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ECL-Reagenzien	Perkin Elmer, Waltham, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol analytical grade	Serva, Heidelberg
Ethanol ca. 96%ig	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromidlösung 0,0025%	Roth, Karlsruhe
Gelbeladungspuffer (6x Loading Dye)	Fermentas, St. Leon-Rot
HCl	Roth, Karlsruhe
Isofluran Forene 100%	Abbott, Wiesbaden
Kristallviolettlösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Laktazystin	Merck, Darmstadt
Lipofectamin LTX mit Plus Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Lucifer yellow	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl	Gerbu Biochemie GmbH, Gaiberg
Na ₃ VO ₄	Sigma-Adrich, Taufkirchen
NuPAGE® LDS Probenpuffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Transferpuffer (20X)	Invitrogen, Karlsruhe
O.C.T. Compound TissueTek®	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Öl für Fluoreszenzmikroskopie Immersol™ 518F	Zeiss, Jena

Oligo dT-Primer (15mer, 80µM)	Qiagen, Hilden
Paraformaldehyd (16%)	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
PBS pH 7,4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Gibco, Karlsruhe
PCSK (Pam ₃ CysSK4, Lot#L08/02 und #A10/02)	EMC Microcollections GmbH, Tübingen
Phalloidin (AlexaFluor®647 gekoppelt)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphataseinhibitor PhosphoStop Tabletten	Roche, Mannheim
PMSF Plus	Roche, Mannheim
Proteaseinhibitor Complete Mini Tabletten	Roche, Mannheim
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
RNase Out	Invitrogen, Karlsruhe
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	Adefo Chemie, Dietzenbach
Röntgen-Fixierer-Konzentrat	Adefo Chemie, Dietzenbach
SDS-Lösung (10%)	Ambion, Darmstadt
Simply Blue	Invitrogen, Karlsruhe
STAT3 Inhibitor VI NSC74859	Calbiochem, Darmstadt
TFF3 (human rekombinant)	The GI Company, Framingham, USA
TRI-Reagenz	Ambion, Darmstadt
Tris	MP Biomedicals, Ohio, USA
Triton X-100 (10%)	Thermo Scientific, Schwerte
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.3. Enzyme

HotStar Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	
- AgeI	New England Biolabs, Frankfurt/Main
- NheI	New England Biolabs, Frankfurt/Main
- BspHI	New England Biolabs, Frankfurt/Main

2.1.4. Größenstandards

DNA Größenstandard:

Express DNA Ladder

Fermentas, St. Leon-Rot

Western-Blot Größenstandards:

MagicMark XP

Invitrogen, Karlsruhe

SeeBlue Plus2 Pre-stained

Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5. Geräte

Autoklav 2540 EL

Systec GmbH, Wetttenberg

Bakterieninkubator Heraeus

Thermo Scientific, Schwerte

Bakterienschüttler KS125 basic

IKA Labortechnik, Staufen

ELISA Reader ELx808

Bio-Tek Instruments Inc., Bad

Friedrichshall

Geldokumentationsanlage

Biostep, Jahnsdorf

Heizblock SLTDB-120

Biosan, Riga, Litauen

Kühlblock SC-2

Biosan, Riga, Litauen

Kryotom HM560

Microm, Walldorf

Mikroskope

Nikon TMS

Nikon, Düsseldorf

Laser Scanning Mikroskop Axiovert

100 LSM 510

Zeiss, Jena

Nikon Eclipse E6000

Nikon, Düsseldorf

Leica DMI6000

Leica, Wetzlar

pH-Meter 765 calimatic

Knick, Berlin

Photometer

Eppendorf, Hamburg

Pipetten (research)

0,1 – 2,5µl

0,5 – 10µl

10 – 100µl

100 – 1000µl

Eppendorf, Hamburg

Pipettierhilfe elektrisch

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Realtime PCR-Maschine

Mastercycler ep realplex

Eppendorf, Hamburg

Rollenmischer Stuart SRT 9

Dunn Labortechnik GmbH, Asbach

Scanner EPSON Perfection V750 PRO	Epson, Meerbusch
Schüttler	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
Stromversorger Power Pac300	Bio-Rad, München
Thermocycler GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer, Waltham, USA
Tischzentrifugen	
Mikro 120	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge Hermle Z233 MK-2	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Vortexer	IKA Labortechnik, Staufen
Waagen	
Kern 440-210N	Kern, Balingen-Frommern
MP-3000 Chyo	Göntgen Wägetechnik, Bottrop
Feinwaage Delta Range AT261	Mettler, Giessen
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Widerstandsmeßgerät Millicell®-ERS	Millipore, Eschborn
Xcell II Blot Modul	Invitrogen, Karlsruhe
Xcell <i>SureLock</i> Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkulturinkubator mit CO ₂ Hera Cell	Thermo Scientific, Schwerte
Zellkulturzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.1.6. Lösungen und Puffer

BSA-Blockierungspuffer	5% BSA in TBST oder PBST
DTT	1M in aqua dest.
1x MES-Laufpuffer	250ml NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x) 4750ml aqua dest.
Milch-Blockierungspuffer	5% Magermilchpulver in TBST oder PBST

1x MOPS-Laufpuffer	250ml NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x) 4750ml aqua dest.
Kristallviolett-Färbelösung	2% Ethanol 0,2% Kristallviolett in aqua dest.
PBST	PBS 0,005% Tween-20
Protein Lysepuffer V	1% Triton X-100 150mM NaCl 20mM Tris-HCl pH 7,5 2mM EDTA ad 5ml mit aqua dest.
Röntgen-Entwicklerlösung	200ml Röntgen Entwickler Konzentrat 800ml aqua dest.
Röntgen-Fixiererlösung	200ml Röntgen Fixierer Konzentrat 800ml aqua dest.
Stripping Puffer	10ml 10% SDS-Lösung 3,125ml Tris-HCl pH 6,8 300µl β-Mercaptoethanol ad 50ml mit aqua dest.
TAE-Puffer (Tris Acetat EDTA Puffer)	Qiagen, Hilden
TBST	TBS 0,005% Tween-20

TE-Puffer pH 7,0 (steril)	Ambion, Darmstadt
Transferpuffer	250ml NuPAGE® Transferpuffer (20X) 500ml Methanol 4250ml aqua dest.
Tris Buffered Saline (TBS)	10mM Tris 150mM NaCl in aqua dest. pH 7,6
2.1.7. Kits	
Alpha-2-Macroglobulin ELISA	Assay Pro, St. Charles, USA
C3a BD OptEIA ELISA	BD Biosystems, Heidelberg
C5a BD OptEIA ELISA	BD Biosystems, Heidelberg
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche, Mannheim
Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
One Shot® TOP10 Chemically Competent E.coli Kit	Invitrogen, Karlsruhe
One Step QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Proteo Extract Subcellular Proteome Extraction Kit	Calbiochem, Darmstadt
QiaPrep Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RiboPure Kit	Ambion, Darmstadt
RNase-Free DNase-Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
Sensiscript Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
Shandon Rapid-Chrome™ Frozen Section Staining Kit	Thermo Scientific, Schwerte
Tissue Factor Pathway Inhibitor ELISA Quantikine	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.8. Zellkulturmedien

FCS Endotoxin-frei

Lot # A10207-0103

Lot # A10208-1581

DMEM 4,5g/L Glukose

Insulin

OPTI-MEM

Penizillin/Streptomycin (100x)

Trypsin-EDTA (100x)

PAA, Pasching, Österreich

PAA, Pasching, Österreich

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Gibco, Karlsruhe

PAA, Pasching, Österreich

PAA, Pasching, Österreich

Caco-2-Wachstumsmedium

DMEM 4,5g/L Glukose

20% FCS

1% Penizillin/Streptomycin

Selektionsmedium für die TLR-Klone

DMEM 4,5g/L Glukose

20% FCS

1% Penizillin/Streptomycin

1mg/ml Blastizidin

IEC-6-Wachstumsmedium

DMEM 4,5g/L Glukose

5% FCS

1% Penizillin/Streptomycin

0,1% Insulin

2.2. Methoden**2.2.1. Kultivierung von Caco-2-Zellen**

Caco-2 ist eine gut differenzierte Zelllinie, die einem humanen Kolonadenokarzinom entstammt [56]. Ihre Morphologie ist enterozytenähnlich mit einer typischen Enterozytendifferenzierung, d.h. der Bildung eines polarisierten Monolayers mit "*tight junctions*" und der apikalen Ausbildung einer typischen Bürstensaummembran mit Mikrovillibusatz. Auch funktionell, also in ihrer Enzymaktivität, entsprechen Caco-2-Zellen weitestgehend Enterozyten [148].

Bezogen wurden die Caco-2-Zellen von der "American Type Culture Collection" (ATCC) über "LGC Promochem" (Teddington, England) (ATCC Nummer HTB-37™, Lot #1537739). Die Zellen wurden in Caco-2-Wachstumsmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

Zur Passage der Zellen wurde bei einer Konfluenz von 90-100% das Medium abgesaugt, die Zellen mit frischem Medium abgespült und in ein 50ml Falcon-Gefäß überführt. Die Zellen wurden dann bei 800g und 20°C für 5min abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:4 – 1:10 neu ausplattiert. Caco-2-Zellen wurden von Passage 6 bis Passage 15 verwendet, danach wurden die Zellen verworfen.

Sollte zusätzlich die Zellzahl bestimmt werden, wurden die Zellen trypsinisiert. Hierfür eignete sich eine Konfluenz von 70-80% am besten. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 1x Trypsin/EDTA gespült. Nachdem dies verworfen wurde, wurden pro T25-Kulturflasche 1,5ml und pro T75-Kulturf Flasche 3ml Trypsin/EDTA zugegeben und für 3-4min, bzw. bis sich die Zellen nach leichtem Abschlagen der Flasche lösen, bei 37°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von 10ml Wachstumsmedium gestoppt, die Flasche gründlich abgespült und in ein 50ml Zentrifugengefäß überführt. Die Zellen wurden bei 900g, 4°C für 5min pelletiert und das Zellpellet in frischem Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellzahl und Vitalität konnten im Anschluss in der Neubauer-Zählkammer ermittelt werden (siehe Kap.2.2.3.).

2.2.2. Kultivierung von IEC-6-Zellen

IEC-6-Zellen sind epitheliale, nichttransformierte Zellen aus dem Dünndarm der Ratte (*Rattus norvegicus*) [139]. Die Zellen haben einen diploiden Karyotyp und zeigen neben der Ausbildung von Mikrovilli ein Vorkommen von "*tight junctions*" und einen ausgeprägten Golgi-Apparat. IEC-6 Zellen exprimieren Oberflächenmoleküle, die für undifferenzierte Kryptenzellen typisch sind [138]. Werden die Zellen auf extrazellulärer Matrix kultiviert, können sie ausdifferenzieren und zeigen funktionelle und morphologische Kriterien von Enterozyten des Villusbereiches [33].

IEC-6-Zellen wurden von der ATCC (ATCC Nummer CRL-1592™) über Prof. Dr. Podolsky (Harvard Medical School) bezogen und unserer Arbeitsgruppe ab Passage 15 zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen in IEC-6-Wachstumsmedium

bei 37°C und 5% CO₂. Das Medium wurde dabei zweimal wöchentlich gewechselt. Die IEC-6-Zellen wurden bis Passage 23 benutzt, danach verworfen.

Zur Passage der Zellen und der Zellzahlbestimmung wurden diese bei einer Konfluenz von ca. 80-95%, wie in Kap.2.2.1. für Caco-2-Zellen beschrieben, trypsinisiert und in einem Verhältnis von 1:5 – 1:10 neu ausplattiert.

2.2.3. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität wurden ein Hämocytozometer mit einer Einteilung nach Neubauer (Neubauer-Zählkammer) und der Trypanblau-Ausschluss verwendet. Trypanblau ist ein Farbstoff, der von lebenden Zellen nicht aufgenommen werden kann, in tote Zellen hingegen durch die permeable Zellmembran diffundieren kann. Hierzu wurden 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau-Lösung versetzt und in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Im Mikroskop erschienen die lebenden Zellen ungefärbt und tote Zellen durch die Trypanblau-Einlagerung blau gefärbt. Dadurch ließ sich die Lebendzellzahl pro ml nach folgender Formel ermitteln.

$$\text{Lebendzellzahl} = m * Vf * V * 10^4$$

Dabei steht *m* für die Anzahl der lebenden Zellen in einem Großquadrat, *Vf* für den Verdünnungsfaktor, *V* für das Volumen der Zellsuspension und 10^4 ist der Kammerfaktor. Die Gesamtzellzahl berechnet sich analog, indem man sowohl die lebenden als auch die toten Zellen zählt und unter *m* in die Gleichung einsetzt. Die Vitalität der Zellen kann bestimmt werden, indem man die Lebendzellzahl durch die Gesamtzellzahl dividiert und für eine Angabe in Prozent mit 100 multipliziert.

2.2.4. Einfrieren und Auftauen von Caco-2-Zellen

Caco-2-Zellen wurden mit verschiedenen Zellzahlen eingefroren. Hierbei wurden die Zellen in vollem Wachstumsmedium aufgenommen und mit 1ml in jeweils ein 2ml Kryogefäß überführt. Nach der Zugabe von 70µl DMSO (= 7% Endkonzentration im Medium) wurden die Zellen schnellstmöglich auf –80°C gekühlt. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff verbracht.

Für das Auftauen der Caco-2 Zellen wurden zunächst 3ml Wachstumsmedium in ein 15ml Gefäß vorgelegt. Die Zellen wurden in der Hand oder im 37°C-Wasserbad

zünftig angetaut. Durch die Zugabe von 1ml Wachstumsmedium wurden die Caco-2-Zellen vollständig aufgetaut, in das vorbereitete 15ml Zentrifugengefäß überführt, mit Medium aufgefüllt und für 5min bei 800g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in der entsprechenden Menge Medium aufgenommen und in einer T75-Flasche in Kultur genommen. Der nächste Mediumwechsel fand nach drei bis vier Tagen statt.

2.2.5. Herstellung stabil transfizierter Caco-2-Zellen

2.2.5.1. Vermehrung und Präparation der TLR-Plasmid-DNA

Die pUNO-Vektoren mit den Geninserts der humanen TLR2 und TLR4, sowie der leere Grundvektor pUNO wurden von der Firma InvivoGen in Form von lyophilisierten E.coli Bakterien (Stamm GT110), die den Vektor tragen, bezogen. Zusätzlich zu den humanen TLR-Sequenzen enthielten diese Vektoren ein Resistenzgen für das Antibiotikum Blastizidin, sowie eine kurze Hämagglutininsequenz, das sogenannte "HA-Tag" (siehe Vektorkarten Anhang 6.1. und 6.2.). Dies erlaubt nach einer Transfektion die einfache Identifizierung erfolgreich transfizierter Zellen, da humane Zelllinien diese virale Struktur nicht exprimieren [185]. Es ist gezeigt worden, dass das TLR2-FL-Plasmid nach Überexpression in den Zellen selbst aktivierend ist [36].

Für die Aufzucht der Bakterien wurden LB-Agarplatten und LB-Medium mit Blastizidin hergestellt, damit nur Bakterien, die das Resistenzgen und damit auch die TLR-Sequenz tragen, wachsen konnten. Sowohl der Blastizidin-Agar als auch das Blastizidin-LB-Medium wurden als Fertigpulver von der Firma InvivoGen bezogen und nach Herstellerangaben angesetzt.

Die lyophilisierten E.coli Bakterien wurden bei Raumtemperatur in 1ml Blastizidin-LB-Medium gelöst, 5min äquibriert und dabei mehrmals invertiert. Verschiedene Mengen der gelösten Bakterien (25µl, 50µl, 75µl und 100µl) wurden mit einer sterilen Glaspipette auf je einer Blastizidin-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Übernachtinkubation wurden die Platten bis zur weiteren Verwendung am späten Nachmittag desselben Tages mit Parafilm verschlossen und bei 4°C aufbewahrt.

Zum Ansetzen der kleinen Starterkultur wurden je 5ml vorgewärmtes Blastizidin-LB-Medium in ein 10ml Rundbodenröhrchen vorgelegt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden große, vereinzelt liegende E.coli Kulturen ohne Satelliten von der Agarplatte

genommen und in das vorbereitete Nährmedium überführt. Die Starterkulturen wurden im Anschluss bei 37°C auf dem Schüttler über Nacht inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden 1-1,5ml der Übernacht-Starterkultur in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA der Bakterien mit dem "*QIAprep Miniprep Kit*" nach Herstellerangaben präpariert. Hierbei werden die Bakterien lysiert und die DNA wird an eine Silicamembran gebunden, mehrmals gewaschen und schließlich eluiert. Der Rest der Starterkultur wurde bei 4°C gelagert, bis die große Kultur am späten Nachmittag mit dieser angesetzt wurde.

Die Bakterien-DNA wurde dann in einen Restriktionsverdau (siehe Kap.2.2.5.2.) eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Bakterien das richtige Insert enthielten. Die Proben, die den entsprechenden TLR als Insert trugen und die höchsten DNA-Konzentrationen aufwiesen, wurden dann in die große Übernachtkultur für die finale DNA-Präparation eingesetzt. Hierfür wurden 200ml Blasticidin-LB-Medium in einen 500ml Erlenmeyerkolben mit 200µl der jeweiligen Starterkulturen angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler bei 200rpm inkubiert.

Aus der gesamten Kultur wurde am nächsten Tag die Plasmid-DNA mithilfe des "*EndoFree Plasmid Maxi Kits*" präpariert. Die Bakterien werden hierbei unter alkalischen Bedingungen lysiert, wobei ein Puffer zur Endotoxin-Entfernung zugesetzt wird. Das Lysat wird auf eine Säule geladen, in der die DNA an die Membran bindet, gewaschen, eluiert und aufkonzentriert wird. Zum Abschluss wurde die DNA unter sterilen Bedingungen in sterilem, endotoxin-freien TE-Puffer gelöst. Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurde am Photometer gemessen und nochmals durch einen Restriktionsverdau überprüft.

Die so isolierte DNA der Vektoren pUNO, pUNO-hTLR2-HA und pUNO-hTLR4-HA wurde in Transfektionsversuchen mit Caco-2-Zellen eingesetzt. Im Falle der beiden Vektoren pUNO-hTLR2-HA und pUNO-hTLR4-HA wurde ein Teil der DNA für die Erzeugung der Mutationen TLR2-R753Q, TLR4-D299G und TLR4-T399I an die Firma Trenzyme (Konstanz) geschickt. Die restliche Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.2. Überprüfung der Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau

Restriktionsendonucleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die je nach Spezifität zumeist vier bis acht Basenpaare in einem DNA-Strang erkennen und diese Zielsequenz schneiden.

Diese Restriktionsenzyme werden unter anderem zur Überprüfung, ob ein Vektor das gewünschte Insert trägt, eingesetzt. Hierzu wählt man zwei Restriktionsenzyme, die möglichst nah am Insert schneiden. Im Falle der TLR2-Plasmide wurden die beiden Enzyme AgeI und NheI gewählt, und zur Überprüfung der TLR4-Plasmide BspHI und NheI. Die optimalen Pufferbedingungen wurden der Webseite des Herstellers entnommen, so dass sich folgende Ansätze für den Verdau der beiden Plasmide ergaben:

Tab.2.1. Ansätze für die Mastermixe der Restriktionsverdaue für die pUNO-TLR2-HA und pUNO-TLR4-HA Vektoren.

pUNO-TLR2-HA

Reagenz	Konzentration	Volumen/Verdau
NEBuffer 1	1X	1µl
NheI	10 units	1µl
AgeI	10 units	2µl
BSA	1X	1µl
Plasmid-DNA		5µl

Gesamtvolumen

10µl

pUNO-TLR4-HA

Reagenz	Konzentration	Volumen/Verdau
NEBuffer 2	1X	1µl
NheI	10 units	1µl
BspHI	10 units	1µl
BSA	1X	1µl
H ₂ O		1µl
Plasmid-DNA		5µl

Gesamtvolumen **10µl**

Die Ansätze wurden durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt und der Verdau jeweils für 1h bei 37°C im Heizblock durchgeführt. Die Auswertung erfolgte im Anschluss mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.2.5.3.).

2.2.5.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erlaubt es, DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend aufzutrennen und zu identifizieren. Hierfür wird an ein Agarosegel in Pufferlösung ein elektrisches Feld angelegt, in dem die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch die Gelmatrix wandern. Die kleineren Moleküle können sich dabei schneller durch die Siebstruktur der Agarose bewegen. Sichtbar gemacht werden die aufgetrennten DNA-Banden nach dem Lauf durch den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der in die Doppelhelix-Struktur der DNA interkaliert und nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert.

Im Einzelnen wurden 2%ige Agarosegele hergestellt, wobei 1x TAE-Puffer sowohl zum Lösen der Agarose als auch als Laufpuffer verwendet wurde. Nach dem Aufkochen von 1g Agarose in 50ml TAE-Puffer wurde die Flüssigkeit kurz abgekühlt und vier Tropfen einer 0,0025%igen Ethidiumbromidlösung zugegeben. Nach kurzem Durchmischen der Agaroselösung wurde diese in eine Gelkammer gegossen und es wurden Kämme eingesetzt. Nach dem Aushärten des Gels wurden die Kämme für die Geltaschen entfernt und das Gel mit Laufpuffer großzügig bedeckt. Die Proben

wurden mit der entsprechenden Menge eines Gelbeladungspuffers versetzt, damit sie in die Geltaschen absinken. Im Anschluss wurden diese im Gel bei 90 Volt für ca. 45min aufgetrennt.

Die Gele wurden nach ausreichender Auftrennung der Proben unter UV-Anregung betrachtet und mit einer Gel-Dokumentationsanlage fotografiert und ausgewertet.

2.2.5.4. Herstellung der mutierten Vektoren

Zur Herstellung der mutierten Vektoren pUNO-hTLR2-HA-R753Q (rs5743708), pUNO-hTLR4-HA-D299G (rs4986790) und pUNO-hTLR4-HA-T399I (rs4986791) wurde DNA der beiden Plasmide pUNO-hTLR2 und pUNO-hTLR4-HA an die Firma Trenzyme (Konstanz) geschickt. Dort wurden die gerichteten Punktmutationen erzeugt, durch Sequenzierung des Geninserts bestätigt und die gelöste DNA zurückgesandt.

2.2.5.5. Klonierung der mutierten Vektoren

Die DNA der mutierten Vektoren wurde mit dem *"OneShot® TOP10 Chemically Competent E.coli Kit"* entsprechend der Herstellerangaben in die mitgelieferten chemisch kompetenten E.coli Bakterien transformiert. Die weitere Aufzucht der Bakterien und die Präparation der DNA erfolgte wie unter Kap.2.2.5.1. beschrieben.

2.2.5.6. Stabile Transfektion der Caco-2-Zellen

Unter stabiler Transfektion versteht man, fremde DNA-Sequenzen langfristig in das Genom einer Zelle zu integrieren. Dabei kann das fremde genetische Material auf verschiedene Weisen in die Zelle eingebracht werden. Hier wurde die sogenannte Lipofektion verwendet, bei der die DNA an die Oberfläche kationischer Lipidvesikel komplexiert wird [50]. Diese Vesikel können sehr leicht mit der Zellmembran fusionieren, welches die komplexierte DNA in die Zelle einbringt. In der Zelle öffnet dann der kationische Teil das DNA-Rückgrat und die fremde DNA wird in das Genom integriert. Damit dies nicht nur vorübergehend (transient) ist, sondern längerfristig (stabil) hält, schleust man mit der gewünschten DNA-Sequenz noch ein Resistenzgen gegen ein Antibiotikum (hier Blastizidin) ein. Dies ermöglicht unter Selektionsbedingungen nur ein Überleben erfolgreich transfizierter Zellen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit werden Flachbodenplatten für die Zellkultur als "Well-Platten" und die einzelnen Vertiefungen der Platten als "Wells" bezeichnet.

Am Vortag der Transfektion wurden Caco-2-Zellen einer jüngeren Passage (P10 bis 12) in Wachstumsmedium ohne Antibiotikum auf eine Poly-D-Lysin beschichtete 12-Well-Platte so ausplattiert, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 30-40% aufwiesen. Die Transfektion wurde dann in OPTI-MEM mit dem Lipofektionsreagenz "Lipofectamine LTX" und dem "Plus Reagenz" nach optimierten Herstellerangaben durchgeführt. Im Detail wurden pro Well 1µg DNA zunächst mit 1µl verdünntem "Plus Reagenz" für 5min inkubiert, um dann innerhalb von 30min Inkubationszeit mit 2,5µl "LTX Reagenz" in 200µl Gesamtvolumen zu komplexieren. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurde in dem entsprechenden Well das Medium abgesaugt und durch 1ml OPTI-MEM ersetzt. Dann wurden 200µl der LTX-Plus-DNA-Komplexe zu den Zellen gegeben und für 4h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, ehe das OPTI-MEM mit den Transfektionsreagenzien abgesaugt und durch Wachstumsmedium ohne Antibiotikum ersetzt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ weiter inkubiert.

2.2.5.7. Selektion einzelner Klone

Ca. 48h nach Transfektion wurden die Zellen aus der Zellkulturplatte gelöst und in 6 Wells einer Poly-D-Lysin 12-Well-Platte in vollem Wachstumsmedium überführt. In jeweils 2 Wells wurden zusätzlich 0,5µg/ml, 1µg/ml bzw. 5µg/ml des Selektionsantibiotikums Blastizidin gegeben und die Zellen weiterhin bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen des Blastizidins wurden aufgrund einer zuvor durchgeführten Dosis-Toxizitätskurve mit untransfizierten Caco-2-Zellen gewählt.

Im weiteren Kulturverlauf zeigte sich, dass die Selektion der transfizierten Klone unter 1µg/ml Blastizidin am erfolgreichsten war. Eine Blastizidinkonzentration von 5µg/ml stellte sich als zu hoch heraus, da die transfizierten Caco-2-Zellen nicht adhärent wurden und bei einer Konzentration von 0,5µg/ml Blastizidin fand keine sichtbare Selektion statt.

Nach 10 Tagen Kultur wurden Zellen vereinzelt und in jeweils ein Well einer Poly-D-Lysin beschichteten 24-Well-Platte mit 1ml Selektionsmedium überführt. Hierzu wurde eine sterile 10µl Pipettenspitze auf die transfizierten Caco-2 Zellen gesetzt, 2µl

Medium und Zellen aufgenommen und in je einem Well der 24-Well-Platte wieder herauspipettiert.

Die so isolierten Klone wurden zur Expansion nach Erreichen der Konfluenz des 24-Wells auf ein Poly-D-Lysin beschichtetes 12-Well passagiert, danach in eine Poly-D-Lysin beschichtete T25-Kulturflasche. In diesem Stadium wurde ein erstes Zelllysats zur Überprüfung der Expression des Transgens (siehe Kap.2.2.10.1.) abgenommen.

2.2.5.8. Kultivierung der stabil transfizierten Klone

Die stabil transfizierten Klone wurden in ihrem Selektionsmedium kultiviert. Das Selektionsantibiotikum Blastizidin wurde dabei direkt vor dem Mediumwechsel in das Caco-2-Wachstumsmedium gegeben und gut vermischt. Hierbei wurden, falls nicht anders angegeben, ausschließlich Poly-D-Lysin beschichtete Zellkulturgefäße verwendet.

Das Passagieren und Trypsinieren wurde, wie zuvor für untransfizierte Caco-2 Zellen beschrieben (siehe Kap.2.2.1.), durchgeführt, ebenso wie das Einfrieren und Auftauen der Klone (siehe Kap.2.2.4.).

2.2.6. Ausplattieren für die Ernte von mRNA, Protein und konditioniertem Medium

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Zellen trypsiniert und mit 3×10^5 Zellen pro Well einer Poly-D-Lysin 6-Well-Platte in 2ml Medium ausplattiert. Das Medium wurde an Tag 3 und Tag 7 durch Frisches ersetzt und die Zellen an Tag 8 entweder in "*TRI-Reagenz*" (mRNA, siehe Kap.2.2.9.1.) oder Lysepuffer (Protein, siehe Kap.2.2.10.1.) aufgenommen oder der Überstand als konditioniertes Medium eingefroren.

2.2.7. Ernte von konditioniertem Medium

Die Zellen wurden wie unter Kap.2.2.6. beschrieben ausplattiert und kultiviert. Ca. 18-24 h nach dem letzten Mediumwechsel wurde das Medium auf Eis abgenommen und in ein 1ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Um mögliche verbliebene Zellen oder Zelltrümmer zu entfernen, wurde das konditionierte Medium bei 14.500g und 4°C für 5min zentrifugiert. Das Medium wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß überführt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.8. Aufkonzentrieren von konditioniertem Medium

Das konditionierte Medium wurde wie unter Kap.2.2.7. beschrieben abgenommen und direkt auf die Mediumkonzentriersäule Amicon Ultra-4 pipettiert. In der anschließenden Zentrifugation für 10min bei 4000g und 4°C wurde das Medium durch die Säule aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde entweder direkt mit LDS-Probenpuffer versetzt und in einen Western-Blot eingesetzt oder bei –20°C bis zum späteren Gebrauch eingefroren.

2.2.9. Molekularbiologische Methoden

2.2.9.1. Aufnahme der Zellen in "TRI-Reagenz"

Als Vorbereitung für die Isolation von mRNA aus einer Zelle muss die Zelle zunächst lysiert und die mRNA freigelegt werden, ohne dabei zu degradieren. Dazu wurde das Medium abgesaugt und 1ml "*TRI-Reagenz*" aus dem anschließenden RNA-Isolationskit auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden gründlich mit dem "*TRI-Reagenz*" abgespült und 5min bei Raumtemperatur lysiert. Abschließend wurden die Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt und bis zur mRNA-Isolation sofort bei –80°C eingefroren.

2.2.9.2. Isolation von "messenger-RNA" (mRNA)

Die mRNA der Zellen wurde zunächst mithilfe des "*RiboPure Kits*" nach Herstellerangaben isoliert. Das Kit basiert auf einer abgewandelten Phenol/Chloroform RNA-Isolation. Im "*TRI-Reagenz*", das Phenol und Guanidin-Thiozyanat enthält, werden die Zellen homogenisiert und lysiert. Durch Zugabe von Bromochloropropan (BCP) kommt es zur Bildung einer wässrigen und einer organischen Phase. Die mRNA wird dann durch Bindung an einen Glasfaserfilter aus der wässrigen Phase isoliert, mehrmals gewaschen und durch einen Niedrigsalzpuffer eluiert.

Die so isolierte mRNA wurde dann mit dem "*RNeasy Kit*" inklusive eines DNase-Verdau aufgereinigt, wobei mit den Kits ebenfalls nach Herstellerangaben verfahren wurde. Hierbei wird die mRNA durch eine Guanidin-Isothiozyanat-Lyse vorisoliert, an eine Silica-Membran gebunden, verbliebene DNA-Reste werden durch einen DNase-Verdau entfernt, ehe die mRNA mehrmals gewaschen und abschließend in Wasser eluiert wird.

Die mRNA wurde am Photometer auf Konzentration und Reinheit überprüft und bei -80°C eingefroren, bis diese in eine quantitative Realtime-RT-PCR eingesetzt oder in cDNA umgeschrieben wurde.

2.2.9.3. Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Reverse Transkription bezeichnet die Umkehrung eines natürlich in der Zelle ablaufenden Prozesses. In der Zelle wird eine DNA-Sequenz mithilfe eines Enzyms, der RNA-Polymerase, in eine einzelsträngige mRNA umgeschrieben, die wiederum als Matrize für die Proteinsynthese dient.

Im Gegensatz dazu wird in der Reversen Transkription eine einzelsträngige mRNA in einen DNA-Doppelstrang, die sogenannte cDNA, "complementary DNA", umgeschrieben. Diese Reaktion wird enzymatisch durch die Reverse Transkriptase katalysiert.

Durchgeführt wurde die Reverse Transkription mit dem "*Sensiscript Reverse Transcription Kit*". Zusätzlich zu den Reagenzien des Kits wurden Oligo-dT-Primer und als RNase Inhibitor "*RNase Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor*" verwendet. Pro Reaktion wurden 50ng mRNA in einem Volumen von 5µl eingestellt und mit folgendem Reaktionsansatz für 60min bei 37°C in cDNA umgeschrieben:

Tab.2.2. Mastermix für die Reverse Transkription mit dem "*Sensiscript Reverse Transcription Kit*".

Reagenz	Konzentration	Finale Konzentration	Volumen/Reaktion
10x Buffer RT	10x	1x	2µl
dNTP Mix	5mM	0,5mM	2µl
Oligo-dT-Primer	80µM	1µM	0,25µl
RNase OUT	40units/µl	10u	0,25µl
Sensiscript Reverse Transkriptase			1µl
H ₂ O			9,5µl

2.2.9.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode, um DNA Abschnitte *in vitro* zu amplifizieren. Hierzu werden neben der Template DNA eine thermostabile DNA-Polymerase (meistens eine Taq-Polymerase), zwei das zu vervielfältigende DNA-Stück flankierende Oligonukleotidsequenzen ("*forward*" und "*reverse*" Primer), Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) und eine Pufferlösung benötigt. Diese erstellt durch verschiedene Ionen und Salze optimale Bedingungen für die DNA-Polymerase.

Der PCR-Prozeß besteht aus drei Reaktionen, die in 25-40 Zyklen im Thermocycler wiederholt werden. Während der *Denaturierung* wird die DNA in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt, so dass sich im "*Annealing*" die Primer an die flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genbereiches anlagern. In der abschließenden *Elongation* füllt die DNA-Polymerase beginnend an den Primern die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf, so dass mit jedem Zyklus die DNA zwischen den beiden Primern verdoppelt wird.

Ausgewertet wird eine PCR durch eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap.2.2.5.3.).

2.2.9.5. Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Setzt man in eine PCR nicht genomische DNA, sondern eine zuvor in einer Reversen Transkription umgeschriebene cDNA ein, so bezeichnet man dies als RT-PCR.

Da hierbei eine festgelegte Menge mRNA (50ng) in cDNA umgeschrieben wurde, was zusätzlich durch die Untersuchung der Expression des "*housekeeping-Gens*" Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verifiziert wurde, erlaubt diese Methode eine semiquantitative Analyse der Genexpression.

Im Einzelnen wurden folgende Primer mit dem NCBI-Primerprogramm "*Primer-Blast Primer designing tool*" selbst entworfen und von der Firma Eurogentec (Köln) synthetisiert:

Tab.2.3. Verwendete Primer für die RT-PCR.

Genname	Sequenz	Länge PCR-Produkt
GAPDH		
"forward"	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'	306bp
"reverse"	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'	
TLR2 endogen		
"forward"	5'-GCCAAAGTCTTGATTGATTGG-3'	347bp
"reverse"	5'-TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG-3'	
TLR2HA		
"forward"	5'-GATGCCTACTGGGTGGAGAA-3'	356bp
"reverse"	5'-AGTCTGGCACATCATAGGGG-3'	
TLR4 endogen		
"forward"	5'-TGGATACGTTTCCTTATAAG-3'	507bp
"reverse"	5'-GAAATGGAGGCACCCCTTC-3'	
TLR4HA		
"forward"	5'-CCAGGATGAGGACTGGGTAA-3'	513bp
"reverse"	5'-AGTCTGGCACATCATAGGGG-3'	
Cx43		
"forward"	5'-GGACATGCACTTGAAGCAGA-3'	485bp
"reverse"	5'-CAGGAGGAGACATAGGCGAG-3'	
ZO-1		
"forward"	5'-GTCTGCCATTACACGGTCCT-3'	548bp
"reverse"	5'-GGTCTCTGCTGGCTTGTTTC-3'	

Die PCRs zu den einzelnen Primern wurden mit derselben *"HotStar Taq-Polymerase"* durchgeführt, so dass jeweils ein Mastermix nach folgendem Schema für die entsprechende Probenanzahl angesetzt wurde:

Tab.2.4. Mastermix für die RT-PCR

Reagenz	Konzentration	Finale Konzentration	Volumen/Reaktion
PCR-Puffer	10x	1x	2,5µl
dNTP Mix	10mM	0,20mM	0,5µl
<i>"forward Primer"</i>	8µM	0,5µM	1,6µl
<i>"reverse Primer"</i>	8µM	0,5µM	1,6µl
HotStar Taq	5u/µl	0,05u/µl	0,25µl
H ₂ O			19,05µl

Der PCR-Puffer wurde mit der Taq-Polymerase mitgeliefert, die dNTPs wurden von Invitrogen bezogen.

25µl des Mastermix wurden in ein PCR-Tube vorgelegt, 2µl cDNA bzw. 2µl H₂O oder als Kontrolle der Ausgangs-mRNA 2µl mRNA zugegeben. Die PCR wurde dann im Thermocycler nach folgendem Protokoll durchgeführt:

	15min	95°C
32 Zyklen	1min	94°C
	1min	58°C
	1min	72°C
	8min	70°C
	unendlich	4°C

Für den Nachweis von Cx43 wurde die Zyklenzahl aufgrund der niedrigen Genexpression in Caco-2-Zellen auf 37 Zyklen erhöht.

Zur abschließenden Auswertung der PCRs wurden Agarose-Gelelektrophoresen der Proben durchgeführt.

2.2.9.6. Quantitative Realtime RT-PCR

Die quantitative Realtime PCR ist eine Amplifikationsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich die Quantifizierung

der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Im Reaktionspuffer für die Realtime PCR ist ein Fluoreszenzfarbstoff, hier SYBR Green, enthalten, der in neu synthetisierte DNA interkaliert und auf Anregung fluoresziert. Diese Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge des PCR Produkts zu und wird von der PCR-Maschine in Echtzeit angezeigt.

Hier wurde das *"One Step QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit"* der Firma Qiagen nach Herstellerangaben mit dem *"Mastercycler ep realplex"* verwendet. Dabei wird mRNA als Template eingesetzt und in einem ersten Schritt in cDNA umgeschrieben, ehe die eigentliche PCR beginnt. Nach den PCR-Zyklen ist noch eine Schmelzkurve im Programm inbegriffen, die zur Überprüfung der Größe des PCR-Produktes dient.

Für die Auswertung wurde die Kopienzahl der einzelnen Transkripte berechnet und ihre relative Konzentration auf das *"housekeeping-Gen"* GAPDH bezogen (Kopienzahl/Kopienzahl GAPDH x 100.000).

In der folgenden Tabelle werden die verwendeten Primer der Firma Qiagen aufgeführt.

Tab.2.5. Verwendete Realtime Primer (*"QuantiTect Primer Assays"*, Qiagen).

Gensymbol	Genspezifität	Primername	QuantiTect Nummer
A2M	Alpha-2-Makroglobulin	Hs_A2M_1_SG	QT00037093
ANXA1	Annexin A1	Hs_ANXA1_1_SG	QT00078197
C3	C3	Hs_C3_2_SG	QT01680413
C5	C5	Hs_C5_1_SG	QT00088011
cMyc	cMyc	Hs_MYC_2_SG	QT01878520
COX-2	Cyclooxygenase-2	Hs_PTGS2_1_SG	QT00040586
Cx43	Connexin43	Hs_GJA1_1_SG	QT00012684
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Hs_GAPDH_2_SG	QT01192646

IL2RG	Interleukin 2 Rezeptor Gamma	Hs_IL2RG_1_SG	QT00000056
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription	Hs_STAT3_1_SG	QT00068754
SI	Sucrase-Isomaltase	Hs_SI_1_SG	QT00061474
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor	Hs_TFPI_1_SG	QT00086149

2.2.10. Proteinnachweismethoden

2.2.10.1. Herstellung eines Gesamt-Protein-Zelllysates

Adhärenent wachsende Zellen wurden in ihrem Kulturgefäß auf Eis gestellt und das Kulturmedium abgesaugt. Um verbliebene Mediumreste zu entfernen wurden die Zellen mit eiskaltem PBS mit 100µM Na_3VO_4 gewaschen. Zellen aus Suspensionskulturen wurden abgespült, in ein Zentrifugengefäß überführt und bei 800g für 5min bei 4°C abzentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt, das Pellet in eiskaltem PBS + Na_3VO_4 resuspendiert und erneut bei 800g und 4°C für 5min abzentrifugiert.

Nach dem gründlichen Absaugen des PBS wurde die entsprechende Menge Lysepuffer, dem pro 5ml je eine halbe Tablette Proteaseinhibitor und Phosphataseinhibitor zugefügt wurde, auf die Zellen gegeben. Pro 100µl Lysepuffer wurde zusätzlich 1µl PMSF frisch zugegeben. Die Zellen wurden abgeschabt bzw. das Pellet gründlich resuspendiert, 5min auf Eis weiter inkubiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Zelllysate wurde für 20min bei 14.000g und 4°C abzentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation als Gesamt-Protein-Zelllysate abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Das Pellet wurde verworfen.

2.2.10.2. Herstellung eines Proteinlysates verschiedener Zell-Kompartimente

Neben der Herstellung eines Gesamt-Protein-Zelllysates wurden mit dem *"ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit"* Proteinlysate der verschiedenen Zellkompartimente gewonnen. Hierbei wurden die Zellen nach Herstellerangaben schrittweise durch vier verschiedene Lysepuffer lysiert und Proteinextrakte des Zytosols, von Membranen und Organellen, des Zellkerns und des Zytoskeletts

gewonnen. Die Proben wurden ebenfalls bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.10.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen sämtlicher Zelllysate wurden mit dem *"BioRad Protein-Assay"* der Firma Bio-Rad bestimmt. Hierzu wurden 200 μl der *"Protein-Assay Substanz"* in ein 1ml Eppendorfgefäß vorgelegt, 800 μl aqua dest. zugegeben und durch Vortexen gründlich gemischt. Je nach Zelltyp und erwarteter Proteinkonzentration wurden 1-10 μl des Proteinlysates zugegeben, nochmals gründlich vermischt und die Absorption der Proben am Photometer bestimmt. Aufgrund einer zuvor erstellten Standardkurve wurde die Proteinkonzentration vom Photometer direkt berechnet und ausgegeben.

2.2.10.4. Western-Blot (Immunoblot)

Der Western-Blot ermöglicht die Identifizierung eines spezifischen Proteins innerhalb eines Proteingemisches. Das Proteingemisch wird dabei zuerst durch eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese entsprechend der Molekularmasse der einzelnen enthaltenen Proteine aufgetrennt. Bei einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese passieren die Proteine zuerst ein Sammelgel, in dem sie zu einer scharfen Bande fokussiert werden, ehe sie in das eigentliche Trenngel einwandern. Das Trenngel ist wesentlich kleinporiger als das Sammelgel, so dass durch die angelegte Spannung kleinere Proteinmoleküle schneller durch das Gelnetzwerk wandern können, wohingegen größere Proteine zurückbleiben. Im Anschluss an die Auftrennung werden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen (*"Blotting"*). Nach der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, dem sogenannten Blockieren, wird die Membran mit dem Antikörper gegen das gewünschte Protein inkubiert. Der Nachweis dieser Bindung erfolgt dann durch einen zweiten, speziesspezifischen Sekundärantikörper. An diesen Sekundärantikörper ist ein Enzym gekoppelt, welches dann durch Umsetzung seines Substrates die Antikörperbindung visualisiert.

Im Einzelnen wurde das *"Xcell SureLock™ Mini-Cell"* System mit dem *"Xcell II™ Blot Module"*, den *"NuPAGE 4-12% Bis-Tris SDS-Page"* Gelen und den dazugehörigen Puffern der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben benutzt.

Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden zunächst für ein 10-Well "4-12% Bis-Tris Gel" in 30µl mit gleichen Proteinmengen (55-90µg) angeglichen, 10µl NuPAGE LDS Probenpuffer und 4µl 1M DTT zugegeben. Für ein 12-Well Gel wurden dementsprechend die Proben auf ein Gesamtvolumen von 20µl mit gleicher Proteinmenge (55-70µg) eingestellt und mit 5µl Probenpuffer und 2µl 1M DTT versetzt. Die Proben wurden im Anschluss für eine bessere Linearisierung 2min bei 85°C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und direkt auf das Gel geladen. Als Größenstandards wurden zusätzlich 6µl "SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard" bzw. "MagicMark XP Western Protein Standard" auf das Gel gegeben. Abhängig vom Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins wurde das Gel in 1X MOPS-Laufpuffer, bzw. bei kleinen Proteinen (< 30kDa) 1X MES-Laufpuffer, bei 160V zwischen 60 und 120min laufengelassen. Während der Laufzeit wurden die Schwämme für den Aufbau der Blotting-Apparatur in Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde zunächst für ca. 5min in Methanol gelegt, ehe auch sie, ebenso wie zwei Whatmann-Papierstücke, in den Transferpuffer verbracht wurden. Nach Beendigung der Proteinauftrennung wurde das Gel folgendermaßen in die Blotting-Apparatur eingebracht.

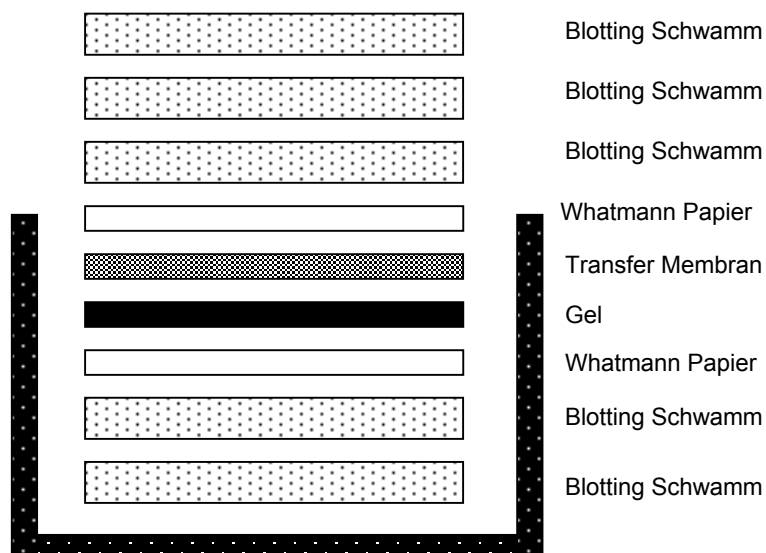


Abb.2.1. Aufbau des Blottingmoduls (adaptiert nach "Using the Xcell II™ Blot Module", Invitrogen).

Das Blottingmodul wurde mit Transferpuffer befüllt und zur Kühlung in die äußere Kammer aqua dest. eingefüllt. Der Transfer auf die Membran erfolgte dann bei 30V in 60-90min. Nach Abbau der Blotting-Apparatur wurde die Membran, abhängig vom

Erstantikörper, in 25ml Blockierungspuffer für mindestens 60min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Erstantikörperinkubation erfolgte dann in 2ml Puffer mit der entsprechenden Konzentration des Antikörpers (siehe Tabelle 2.6.) in einem 50ml Röhrchen auf einem Rollmischer bei 4°C über Nacht. Die Gele wurden mit *"Simply Blue"* auf verbliebene Proteine gefärbt (s. Kap.2.2.10.5.).

Am nächsten Tag wurde in drei 5minütigen Waschschritten mit TBST oder PBST überschüssiger, ungebundener Erstantikörper von der Membran entfernt. Im Anschluss wurde die Membran in 25ml Blockierungspuffer mit 3µl eines speziesgerichteten, Meerrettichperoxidase- (HRP-) gekoppelten Sekundärantikörpers (HRP-anti-Maus oder HRP-anti-Kaninchen, beide GE Healthcare) für 60min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Inkubationszeit konnte der Sekundärantikörper den Erstantikörper binden und durch die Kopplung des Enzyms für die anschließende chemolumineszente Detektion vorbereiten. Die Membran wurde erneut dreimal 5min gewaschen und kurz mit Whatmanpapier abgetrocknet. Für 1min wurde die Membran in jeweils 3ml zweier enzymatischer Chemolumineszenzreagenzien (ECL-Reagenzien), die unmittelbar vorher vermischt wurden, geschüttelt. Nach erneutem Abtrocknen wurde die Membran dann in eine Röntgenfilm-Entwicklungskassette in Frischhaltefolie eingelegt.

In die Kassette wurden unter Lichtausschluss Filme, abhängig von der Signalstärke, für bis zu 25min auf die Membran aufgelegt. Nach ca. 1min in der Röntgen-Entwicklerlösung, einem kurzen Waschschriff in Wasser und ca. 3min in der Röntgen-Fixiererlösung, wurden die Filme 10min unter fließendem Wasser gewaschen und abschließend in einem Wärmeschriff bei 37°C getrocknet.

Anhand der verwendeten Größenstandards konnten die sichtbaren Banden ausgewertet und zugeordnet werden.

Die Blots wurden dann mit dem EPSON Perfection V750 PRO Scanner eingelesen und unverändert in die Arbeit eingefügt.

Tab.2.6. Western-Blot Erstantikörper und ihre Anwendung.

Antikörper Spezifität	Klon	Spezies	Größe [kDa]	Bezugsquelle
β-Aktin	AC-74	Maus	42	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BIP/GRP78	40/BiP	Maus	78	BD Transduction Lab, Heidelberg
cMyc	9E10	Maus	62	BD Pharmingen, Heidelberg
COX-2	5E10/D10	Maus	67-70	Calbiochem, Darmstadt
Cx43	CX-1B1	Maus	43	Zymed Invitrogen, Karlsruhe
GAPDH	14C10	Kaninchen	37	Cell Signaling, Danvers, USA
GAPDH	GAPDH- 71.1	Maus	37	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HA-Tag	-	Maus	-	InvivoGen, Toulouse, F
HA-Tag	6E2	Maus	-	Cell Signaling, Danvers, USA
p-STAT3 (Tyr 705) XP™	D3A7	Kaninchen	79, 86	Cell Signaling, Danvers, USA
STAT3	124H6	Maus	79, 86	Cell Signaling, Danvers, USA
TFF3	-	Maus	7, 14	Dr. D.K. Podolsky, Harvard Univ., USA

ZO-1	Z-RI	Kaninchen	ca. 225	Zymed Invitrogen, Karlsruhe
------	------	-----------	---------	--------------------------------

Antikörper Spezifität	Blockierungspuffer	Verdünnung	Antikörperpuffer
β-Aktin	5% Milch/TBST	1:1000	5% Milch/TBST
BIP/GRP78	5% Milch/TBST	1:500	5% Milch/TBST
cMyc	5% Milch/TBST	1:500	5% Milch/TBST
COX-2	5% Milch/TBST	1 :250	5% Milch/TBST
Cx43	5% Milch/TBST	1 :500	5% Milch/TBST
GAPDH	5% Milch/TBST	1:2000	5% Milch/TBST
GAPDH	5% Milch/TBST	1:2000	5% Milch/TBST
HA-Tag	5% Milch/PBST	1:250	5% Milch/PBST
p-STAT3 (Tyr 705)	5% Milch/TBST	1:250	5% BSA/TBST
STAT3	5% Milch/TBST	1:1000	5% Milch/TBST
TFF3	5% BSA/TBST	1:50	0,1% BSA/TBST
ZO-1	5% Milch/TBST	1:500	5% Milch/TBST

2.2.10.5. Anfärbung des Western-Blot Gels mit "*Simply Blue*"

Die Western-Blot Gele können mit der "*Simply Blue*" Substanz, einer abgewandelten Coomassie-Färbung, auf im Gel verbliebene Proteine angefärbt werden. Diese Färbung bietet einen ersten Hinweis auf die gleiche Beladung des Gels und die erfolgreiche Auftrennung der Proteinproben.

Hierzu wurde das Gel mit der "*Simply Blue*" Substanz bedeckt und für mehrere Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, bis sich die Proteinbanden blau färbten.

2.2.10.6. Western-Blot reproben

Auf der geblotteten und entwickelten Membran kann nicht nur ein Protein nachgewiesen werden, sondern bis zu ca. vier verschiedene Proteine nacheinander. Dies empfiehlt sich vor allem, um eine gleichmäßige Beladung des Gels mithilfe des *"housekeeping-Gens"* GAPDH zu überprüfen.

Bevor die Membran mit einem zweiten spezifischen Antikörper inkubiert werden kann, muss der zuvor gebundene Primär-Sekundär-Antikörper-Komplex entfernt, *"gestrippt"*, werden. Hierfür wurde residuelles ECL mit PBST oder TBST in wenigstens drei 5minütigen Waschschritten abgewaschen. Die Membran wurde dann in 50ml Stripping-Puffer für 30min bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Es folgten mehrere, ausgiebige Waschschrritte mit TBST bzw. PBST, ehe die Membran mit einem anderen spezifischen Erstantikörper über Nacht inkubiert (*"reprobt"*) und erneut entwickelt wurde.

2.2.10.7. Immunfluoreszenzfärbungen

Zur morphologischen Charakterisierung der Proteinexpression einer Zelle und Lokalisation des Proteins in der Zelle wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Diese beruhen ebenfalls auf Antigen-Antikörper-Bindungen.

Man unterscheidet hierbei eine direkte Immunfluoreszenzfärbung, bei der ein spezifischer Primärantikörper mit einem Fluorochrom gekoppelt ist, von einer indirekten Färbung, bei der die Bindung des spezifischen Primärantikörpers mithilfe eines speziesspezifischen, fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen wird.

Für beide Färbungen wurden die jeweiligen Zellen auf Poly-D-Lysin beschichteten Objektträgern ausplattiert und ab einer Konfluenz von ca. 80%, verwendet. Mit Gefrierschnitten von Geweben wurden ebenfalls indirekte Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Die Auswertung und Dokumentation der Färbungen erfolgte an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop und mit der entsprechenden Software (siehe Kap.2.2.10.10.).

2.2.10.8. Direkte Immunfluoreszenzfärbung

Direkte Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit dem AlexaFluor® 488-konjugierten Phospho-Histon H3 und dem AlexaFluor® 555-gekoppelten β -Tubulin Antikörper nach Herstellerangaben (Protokolle Cell Signaling #9708 und #2116) durchgeführt. Entsprechend wurden die Zellen fixiert, gewaschen und zusätzlich permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einem Blockierungspuffer abgesättigt und die Antikörper bei 4°C über Nacht unter Lichtausschluss auf den Zellen inkubiert. Im Anschluss wurde überschüssiger Antikörper abgewaschen, die Zellen mit einem DAPI-haltigen Eindeckmedium eingedeckelt, das Präparat mit Nagellack umrandet und am Laser Scanning Mikroskop innerhalb von 24h ausgewertet.

2.2.10.9. Phalloidin Färbung

Eine andere Methode der direkten Immunfluoreszenzfärbung bietet die Phalloidinfärbung von filamentösem Aktin. Diese beruht im Gegensatz zu den anderen aufgeführten Färbungen nicht auf einer Antigen-Antikörperbindung. Bei Phalloidin handelt es sich um ein Toxin des grünen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, das direkt an filamentöses Aktin bindet. Durch die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes AlexaFluor® 647 lässt sich demnach das F-Aktin in der Zelle fluoreszenzmikroskopisch visualisieren. Die Färbung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.10.10. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung ist bis auf einen weiteren Antikörper ähnlich der direkten Immunfärbung. Hierbei sind die Fixierung, das Blocken und die Verdünnungen der Antikörper abhängig von eben diesen und werden in Tabelle 2.7. aufgeführt.

Die Zellen wurden zunächst gewaschen, fixiert und gegebenenfalls permeabilisiert, Gefrierschnitte wurden direkt fixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch ein mindestens 60minütiges Blockieren bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer abgesättigt. Die Präparate wurden über Nacht bei 4°C und unter Lichtausschluss mit dem Primärantikörper in der feuchten Kammer inkubiert. Nichtgebundener Antikörper wurde im Anschluss in drei 5minütigen Waschschritten abgewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde zugegeben und bei

Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 60min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5min wurde das Präparat mit einem DAPI-haltigen Eindeckmedium eingedeckelt, umrandet und am Laser Scanning Mikroskop ausgewertet.

Tab.2.7. Erstantikörper für die indirekte Immunfärbung und ihre Anwendung.

Antikörper Spezifität	Klon	Spezies	Bezugsquelle
Cx43	CX-1D1	Maus	Zymed Invitrogen, Karlsruhe
HA-Tag	6E2	Maus	Cell Signaling, Danvers, USA
IgG Kontrolle		Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
IgG Kontrolle		Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
<i>"Lucifer yellow"</i>	A5750	Kaninchen	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe
Pan-Zytokeratin	H-240	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
TFF3	HM 5119	Kaninchen	Dr. D.K. Podolsky, Harvard University, USA
ZO-1	61-7300	Kaninchen	Zymed Invitrogen, Karlsruhe

Antikörper Spezifität	Fixierung	Blockierungspuffer	Verdünnung
Cx43	Azeton, 1min –20°C	1% Ziegenserum/PBS	1:50 in PBS
HA-Tag	4% Pfa, 10min Raumtemperatur, permeabilisieren mit 0,2% Triton/TBS	10% Ziegenserum/TBS	1:50 in 1% BSA/TBS
"Lucifer yellow"	2% Pfa, 30min Raumtemperatur	Kein Blocken	1:50 in PBS 1h 37°C
Pan-Zytokeratin	Azeton, 1min –20°C	1% Ziegenserum/PBS	1:50 in PBS
TFF3	4% Pfa, 10min Raumtemperatur, permeabilisieren mit 0,2% Triton/TBS	10% Ziegenserum/TBS	1:50 in 1% BSA/TBS
ZO-1	Azeton, 1min –20°C	1% Ziegenserum/PBS	1:50 in PBS

Tab.2.8.Sekundärantikörper für die indirekte Immunfärbungen und ihre Anwendungen.

Antikörper Spezifität	Gekoppeltes Fluorochrom	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege-anti-Kaninchen	FITC	1:100 in PBS	Jackson Immuno- Research Laboratories
Ziege-anti-Kaninchen	Cy5	1:100 in PBS	Jackson Immuno- Research Laboratories
Ziege-anti-Maus	AlexaFluor® 488	1:100 in PBS	Invitrogen

2.2.10.11. Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen am Laser Scanning Mikroskop

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden nach dem Eindeckeln innerhalb der nächsten 24h am konfokalen Laser Scanning Mikroskop Zeiss Axiovert 100M – LSM510 dokumentiert und mit der Zeiss LSM Image Browser Software ausgewertet. Dabei wurden die Multitrack Option des Mikroskops und ein sequenzielles Scannen für jeden einzelnen Kanal benutzt. Damit wird ein mögliches Überlappen der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe und Kanäle rechnerisch ausgeglichen und kompensiert.

Bei gleichen Färbungen wurden alle Bilder unter identischen Bedingungen und Einstellungen aufgenommen. Pro Präparat wurden mehrere Areale dokumentiert. Ein Unterschied zwischen den Präparaten wurde dann als signifikant erachtet, wenn mehr als 70% des Bildausschnittes den beobachteten Effekt zeigten. Kontrollexperimente wurden jeweils mit einer IgG-Isotypen-Kontrolle und ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Isotypen-Kontrollen wurden dabei in der gleichen Konzentration wie der zugehörige Primärantikörper eingesetzt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Die hier dargestellten Abbildungen sind mit Hilfe der Zeiss LSM Image Browser Software standardisiert pseudokoloriert und über die Adobe Photoshop Software unverändert in die Arbeit eingefügt worden.

2.2.10.12. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Neben der Proteindetektion im Western-Blot und der Untersuchung der Proteinlokalisierung in der Zelle durch eine Immunfluoreszenzfärbung kann die Proteinexpression bzw. Proteinsekretion einer Zelle mithilfe des ELISA quantitativ bestimmt werden.

Es gibt verschiedene Formen des ELISA, wobei hier der sogenannte "*Sandwich-ELISA*" verwendet wurde. Wie auch die anderen ELISAs bedient sich diese Methode eines Enzyms als Marker und beruht auf Antigen-Antikörperbindungen. Ein sogenannter Fängerantikörper ist hierbei auf eine 96-Well-Platte gebunden worden, der aus einem Zelllysate oder auch Zellüberständen sein spezifisches Antigen bindet. Nach einigen Waschschritten wurde ein HRP-gekoppelter Detektionsantikörper zugegeben, der den Antigen-Antikörper-Komplex zusätzlich bindet. Überschüssiger Detektionsantikörper wurde erneut abgewaschen und der ELISA durch Zugabe eines

TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Substrates colorimetrisch entwickelt. Die Farbreaktion wurde nach einer definierten Zeit durch die Zugabe von Schwefelsäure als Stopplösung beendet. Der ELISA wurde im Photometer gemessen und ausgewertet, wobei anhand des umgesetzten Substrates und einer essentiellen Standardkurve die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben bestimmt wurden.

Im Einzelnen wurden ein "*Alpha-2-Macroglobulin-ELISA*", ein "*Tissue Factor Pathway Inhibitor-ELISA*", sowie ein "*C3a*-" und ein "*C5a-ELISA*" jeweils nach Herstellerangaben mit Zellkulturüberständen (siehe Kap.2.2.7.) der TLR4-Klone durchgeführt. Dabei wurden in jedem Ansatz sowohl die Standardkurve als auch die einzelnen Proben im Duplikat eingesetzt.

2.2.11. Nachweis der Proliferation (BrdU-Assay)

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Basenanalogen zu Thymidin und kann stattdessen in neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Dementsprechend ist die Menge an eingebautem BrdU mit der Proliferation bzw. der Teilungsrate der Zelle gleichzusetzen. In diesem BrdU-Assay wird das eingebaute BrdU mit Hilfe eines colorimetrischen ELISAs der Firma Roche nachgewiesen.

Hierzu wurden pro TLR-Klon bzw. untransfizierte Caco-2-Zellen als Kontrollen 10.000 Zellen in 100µl Medium pro Well einer unbeschichteten 96-Well-Platte im Sechsfachansatz für drei verschiedene Zeitpunkte (ca. 19h, 43h, 67h) ausplattiert. Normales Wachstumsmedium der Caco-2-Zellen und Selektionsmedium dienten als Mediumleerwerte. Jeweils 18-20h vor der Entwicklung des BrdU-ELISA wurde die BrdU-Lösung in Wachstumsmedium 1:100 verdünnt und 10µl dieser Lösung pro Well zugegeben. Nach einer ca. 18-20ständigen Inkubation im 37°C Inkubator mit 5% CO₂ wurde der ELISA entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt und ungestoppt bei 660nm mit einer Referenzwellenlänge von 490nm im ELISA-Reader gemessen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Medium-Leerwerte gebildet und von den Messwerten der verschiedenen TLR-Klone subtrahiert.

2.2.12. Nachweis der metabolischen Aktivität von Zellen

Der Nachweis der metabolischen Aktivität der Zellen wurde mit dem "*CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation*"-Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieser Assay beruht auf einer colorimetrischen Methode zur Bestimmung der

lebenden, metabolisch aktiven Zellen. Dabei wurde eine stabile wässrige Lösung aus einem MTS Tetrazoliumsalz und dem Stabilisator PES (Phenazin Ethosulfat) direkt auf die Zellkultur gegeben. Während der Inkubationszeit von 4h im Zellkulturinkubator wird das MTS Tetrazolium von den Zellen in ein gefärbtes Formazan reduziert, was wiederum im Kulturmedium löslich ist. Katalysiert wird diese Reaktion von NADPH und NADH, die von Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen gebildet werden.

Für die Messung der metabolischen Aktivität wurden je 10.000 Zellen der TLR-Klone bzw. Caco-2-Zellen pro Well einer 96-Well-Flachbodenplatte im Sechsfachansatz für drei verschiedene Messzeitpunkte (ca. 20h, 43h, 67h) in 100µl Medium ausplattiert. Zusätzlich wurden 6 Wells als Leerwertkontrolle nur mit dem jeweiligen Medium belegt. Jeweils 4h vor den Messzeitpunkten wurde die MTS-Lösung des Kits entsprechend der Herstellerangaben zu den Zellen gegeben und die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach der vierstündigen Inkubation wurde die Reaktion durch die Zugabe einer 10%igen SDS-Lösung gestoppt. Die Platte wurde bei einer Absorption von 490nm und einer Referenzwellenlänge von 660nm im ELISA Reader gemessen. Die gemessene Absorption entspricht der Menge des gebildeten löslichen Formazanproduktes und ist dadurch direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur. Für eine genauere Auswertung wurden Mediumleerwerte von den Messwerten der Zellen subtrahiert.

2.2.13. Messung des transepithelialen Widerstandes (TER)

Caco-2-Zellen können auf einem Zellkulturinsert mit einer PET-semipermeablen Membran mit einer Porengröße von 0,4µm innerhalb von drei Wochen Kultur zu einem geschlossenen, funktionellen Epithel mit klar polarisierten Zellen ausdifferenzieren. Das intestinale Epithel bildet somit eine Barrierefunktion aus, die man mit der Messung des transepithelialen Widerstandes (TER) quantifizieren kann [24].

Hierzu wurden aus je einer konfluenten T75 Kulturflasche mit Caco-2-Zellen bzw. den TLR2-Klonen die Zellen abgelöst, abzentrifugiert und in 25ml Medium aufgenommen, wovon pro Insert 2ml ausplattiert wurden. Unter das Insert wurden in die 6-Well-Platte ebenfalls 2ml Medium gegeben. Pro Zellklon wurden 6 Inserts

ausgesät. Das Medium wurde über einen Zeitraum von drei Wochen alle 3-4 Tage gewechselt, wobei der letzte Mediumwechsel ca. 24h vor Messung des TER stattfand.

Für die TER Messungen wurde das *"Millicell-ERS epithelial vol/ohm meter"* der Firma Millipore nach Herstellerangaben verwendet, wobei die Elektroden nach jeder Messung mit warmem Medium gewaschen wurden. Nach Subtraktion des Mediumleerwertes und des Filterwiderstandes wurden die TER Werte auf die Membrangröße umgerechnet und als $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ausgedrückt.

2.2.14. Matrigel®-Invasionsversuch

Matrigel® ist ein lösliches Basalmembran-Extrakt aus Engelberth-Holm-Swarm-Sarkomen bei Mäusen. Es enthält u.a. Laminin, Kollagen Typ IV, Heparansulfatproteoglykan und Entaktin und stellt somit eine komplexe extrazelluläre Umgebung dar, wie man sie in vielen Geweben findet [92]. Durch Beschichtung einer Transwell-Membran mit Matrigel® wird die Basalmembran im Modell nachgebaut und kann für Untersuchungen des Invasionsverhaltens von Zellen eingesetzt werden [7].

Hier wurden Matrigel®-beschichtete BD Biocoat Zellkulturinserts mit 8µm Porengröße verwendet, die vor Versuchsbeginn rehydriert und im Zellkulturinkubator vorgewärmt wurden.

Caco-2-Zellen und die drei TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden mit den gleichen Zellzahlen wie für die Gewinnung von mRNA, Protein und konditioniertem Medium ausplattiert. Berechnet auf die Wachstumsfläche des Matrigel®-Inserts entsprach dies $1,3 \times 10^5$ Zellen, die in 2ml Medium auf das Insert ausgesät wurden. Unter das Matrigel®-Insert wurden ebenfalls 2ml Medium in die 6-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden für 8 Tage kultiviert, wobei an Tag 3 und Tag 7 das Medium gewechselt wurde, ehe die Inserts an Tag 8 durch eine Kristallviolett-färbung auf Invasion untersucht wurden.

In manchen Versuchsansätzen wurde sowohl zu den Zellen als auch in das untere Kompartiment an Tag eins und bei jedem Mediumwechsel 200nM Cox-2 Inhibitor, 100µM STAT3-Inhibitor bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle zugegeben.

2.2.15. Kristallviolett-Färbung der Matrigel®-Inserts

Die Auswertung des Matrigel®-Invasionsversuches erfolgte durch die Kristallviolett-Färbung der eingewanderten Zellen auf der Unterseite des Matrigel®-Inserts [150].

Hierzu wurde das Insert aus der Zellkulturplatte entfernt und sowohl die oben angewachsenen Zellen als auch verbliebenes Medium aus der oberen Kammer wurden mit einem Wattestäbchen gründlich entfernt. Das Insert wurde zur Fixierung für 15min in 2ml Methanol in eine frische 6-Well-Platte überführt. Im Anschluss wurde das Insert in eine weitere 6-Well-Platte mit 2ml Kristallviolett-Färbelösung gesetzt und für 15min inkubiert. Überschüssige Kristallviolett-Färbelösung wurde mit reichlich aqua dest. entfernt und die Matrigel®-Inserts wurden invertiert und getrocknet. Die Matrigel®-beschichtete Membran der Inserts wurde aus dem Insert herausgeschnitten und mit der Unterseite nach oben auf einen Objektträger gelegt und eingedeckelt. Ein invasives Wachstum der Zellen konnte am Lichtmikroskop bestimmt werden, wobei eingewanderte Zellen durch die Färbung lila sichtbar wurden.

2.2.16. "Scrape wounding Assay"

Mit dem "Scrape Wounding Assay" kann die Zell-Zell-Kommunikation über "gap junctions" nach einer Verwundung und damit auch die Fähigkeit zu einer erfolgreichen Wundheilung von Zellen dargestellt werden. Dabei wird ein fluoreszierender Farbstoff, "Lucifer yellow", durch Verletzung der Zellen in diese eingebracht. Aufgrund seines geringen Molekulargewichtes kann "Lucifer yellow" bei funktionierender Zell-Zell-Kommunikation durch die "gap junctions" von Zelle zu Zelle weiter transportiert werden [47].

Caco-2-Zellen bzw. die beiden TLR2-Klone TLR2-FL und TLR2-R753Q wurden auf Kollagen-I-beschichteten 1-Well-Objektträgern in 500µl Medium ausplattiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde am Vortag des Versuches das Wachstums- bzw. Selektionsmedium ein letztes Mal gewechselt. Die Hälfte der angesetzten Zellen wurde dann mit 20µg/ml PCSK für 8min stimuliert, die andere Hälfte unstimuliert belassen. Nachdem alle Zellen einmal mit 37°C warmem PBS ohne Kalzium und Magnesium gewaschen wurden, wurde 0,05% "Lucifer yellow" in PBS in die Wells gegeben und der Monolayer durch eine Rasierklinge eingeschnitten. Die Zellen

wurden dann für 8min im Zellkulturinkubator inkubiert, überschüssiges "*Lucifer yellow*" abgewaschen und die Zellen in 2% Paraformaldehyd für 30min bei Raumtemperatur fixiert.

Für eine Verstärkung des Signals wurde im Anschluss eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen "*Lucifer yellow*" durchgeführt. Die Präparate wurden dann mit einem Deckelmedium mit DAPI eingedeckelt und auf die Ausbreitung des "*Lucifer yellow*" am Laser Scanning Mikroskop untersucht.

2.2.17. Untersuchung der Restitution durch Migration

Zu einer effektiven Wundheilung gehört eine schnelle Restitution der Zellen am Wundrand, um in die Wunde zu migrieren und diese zu verschließen. In diesem Versuch wurde untersucht, ob die beiden TLR2-Klone TLR2-FL und TLR2-R753Q im Vergleich zu Caco-2-Zellen Faktoren sekretieren, die die Restitution beeinflussen [44, 115].

Hierzu wurden IEC-6-Zellen in ihrem Wachstumsmedium auf 2-Well-Objektträgern kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde der Monolayer mit einer sterilen Rasierklinge eingeschnitten und für weitere 20h in frischem Medium mit 0,1% FCS mit oder ohne weitere Proteinzusätze (jeweils 50µg/ml) kultiviert. Diese Proteine wurden aus dem konditionierten Medium von naiven Caco-2-Zellen, dem TLR2-FL- oder dem TLR2-R753Q-Klon gewonnen. Zusätzlich wurde rekombinantes humanes TFF3 als Positivkontrolle eingesetzt. Die Migration in die Wunde wurde durch eine Phalloidin-Alexa-Fluor-647 (siehe Kap. 2.2.10.8.) und DAPI Färbung sichtbar gemacht und am Laser Scanning Mikroskop ausgewertet.

Hierbei wurden die einzelnen Klone und Bedingungen jeweils im Duplikat angesetzt und pro Objektträger mehrere Wundränder zufällig ausgewertet und die eingewanderten Zellen gezählt.

2.2.18. Xenograft-Modell

Im Xenograft-Modell mit CD1 Nacktmäusen kann die *in vivo* Tumorentstehung von untransfizierten Caco-2-Zellen [42] und den drei TLR4-Klonen TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G untersucht werden.

Gemäß des Tierschutzgesetzes über Versuche an lebenden Tieren wurde ein Antrag beim Landesamt für Natur-, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen gestellt. Das Versuchsvorhaben wurde am 12.10.2009 unter dem Aktenzeichen 8.87-50.10.37.09.255 genehmigt (verantwortlicher Versuchsleiter: Prof. Dr. med. E. Cario). CD1*nu/nu*-Mäuse (weiblich) wurden von Charles River (Sulzfeld) kommerziell erworben. Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen (Helicobacter- und MNV-frei) im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12h im selben Raum gehalten. Die Tiere erhielten autoklaviertes Wasser und autoklaviertes Futter ad libitum und wurden in Filtertop-Käfigen gehalten. Bei den CD1*nu/nu*-Mäusen wurden in Alter von 5 Wochen die Caco-2-Klone TLR4-D299G oder TLR4-T399I oder die Kontrollen TLR4-FL oder untransfizierte Caco-2-Zellen in Isofluran-Anästhesie implantiert: Dazu wurden jedem Versuchstier einmalig 1×10^6 in 200µl Matrigel™/PBS (1:1) gelöste Tumorzellen der Klons oder der Kontrollen in die linke Flankenregion subkutan injiziert (n=3-4 Tiere pro Klon oder Kontrolle). Einen Tag vor Implantation bzw. jeden fünften Tag nach Implantation bis Versuchsende wurde den Mäusen ein blockierender Antikörper gegen Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (anti-Asialo GM1) parallel intraperitoneal appliziert (0.5mg in 500µl PBS) [71]. Während der Versuchszeit wurden die Mäuse täglich auf mögliche pathologische Veränderungen des Verhaltens, einsetzende Kachexie, Bewegungseinschränkungen, Apathie sowie lokale Veränderungen an der Implantationsstelle untersucht. Die Größe des Tumors wurde in mindestens zweitägigen Abständen kontrolliert und mit einer Schieblehre in zwei Dimensionen gemessen. Bei Versuchsende wurden die Tiere durch Zervikaldislokation in tiefer Isofluran-Anästhesie getötet und die Bauchwandtumoren entnommen. Diese wurden in Tissue-Tek O.C.T.™ Compound eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur späteren Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die Tumore bei -80°C eingefroren.

2.2.19. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte der Xenografttumoren wurden arbeitsgruppenintern von Dipl. Biol. Birgit Ey angefertigt. Im Einzelnen wurden mit einem Kryotom Gefrierschnitte mit einer Dicke von 7µm angefertigt und auf einem Objektträger aufgenommen. Bis zu einer späteren Färbung wurden die Schnitte bei -20°C aufbewahrt.

2.2.20. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H/E-Färbung)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist ein Färbeverfahren der Histologie und dient der Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum. Um seine färbende Eigenschaft zu entwickeln muss er zu Hämaun aufbereitet werden. Hämaun färbt die sauren, bzw. basophilen Strukturen an, insbesondere Zellkerne und das Endoplasmatische Retikulum. Eosin hingegen ist ein synthetischer Farbstoff, der alle basischen, eosinophilen Strukturen, wie die Zellplasmae, rot färbt.

Die Gefrierschnitte der Xenografttumoren wurden ebenfalls arbeitsgruppenintern von Dipl. Biol. Birgit Ey mit dem *"Shandon Rapid-Chrome™ Frozen Section Staining Kit"* gefärbt. Die Herstellerangaben des Kits wurden dabei optimiert. Die Schnitte wurden zunächst 3min fixiert und mit aqua dest. gewaschen. Es folgte die 3minütige Färbung mit der Hämatoxylinlösung des Kits und ein Waschschriff in aqua dest.. Nach mehrmaligem Eintauchen in ein *"Blueing Reagenz"* wurden die Objektträger gewaschen und für 30sec in Eosinlösung gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte je zweimal für 4min in 96%igem und 100%igem Ethanol dehydriert. Die Objektträger wurden in *"Xylene Substitute"* getaucht und damit fixiert. Zur längeren Haltbarkeit wurden die gefärbten Schnitte mit CitraMount™ Deckelmedium eingedeckelt und am Lichtmikroskop beurteilt.

2.2.21. Statistik

Soweit nicht anders angegeben, sind alle Daten als arithmetischer Mittelwert \pm SEM aufgeführt. Statistische Analysen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism Software Version 4 (GraphPad, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen, nicht gepaarten Student's t-Test ermittelt und ab einem Wert von $p < 0,05$ als signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Überprüfung der Plasmidpräparationen auf ihr Insert

3.1.1. TLR2-Plasmide

Vor dem Einsatz in den Transfektionsversuchen wurden die präparierten Plasmid-DNAs mittels Restriktionsverdau auf ihr jeweiliges Insert überprüft. Hierzu wurden für die DNA der TLR2-Vektoren pUNO-TLR2-FL und pUNO-TLR2-R753Q (InvivoGen) die Restriktionsenzyme AgeI und NheI verwendet. Diese schneiden die Plasmid-DNA insgesamt dreimal, und zwar an Position 89, 552 und 2959. Somit entstehen drei Fragmente des Vektors mit den Längen 463bp, 2407bp und 2445bp.

In Anhang 6.1. ist die Vektorkarte von pUNO-TLR2-FL der Firma InvivoGen mit den eingezeichneten Schnittstellen der beiden verwendeten Restriktionsenzyme dargestellt. pUNO-TLR2-R753Q zeigt das gleiche Schnittmuster der Enzyme. Die Schnittstellen lagen nicht im Bereich der Punktmutation. Der Sequenzausschnitt dieser Mutation ist ebenfalls in Anhang 6.1. präsentiert.

Zusammenfassend demonstrierten die präparierten TLR2-Plasmide nach Restriktionsverdau das erwartete Insert, und sie konnten somit in den Transfektionsversuchen eingesetzt werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.2. TLR4-Plasmide

Bei den Plasmiden pUNO-TLR4-FL, pUNO-TLR4-T399I und pUNO-TLR4-D299G wurden zur Überprüfung der DNA die beiden Restriktionsenzyme NheI und BspHI eingesetzt. Auch diese Enzyme schneiden die Vektoren dreimal, an den Positionen 456, 569 und 3091, so dass drei Fragmente mit 1448bp, 1476bp und 2522bp entstehen. Die Schnittstellen lagen nicht im Bereich der Punktmutationen. Anhang 6.2. zeigt die Vektorkarte von TLR4-FL der Firma InvivoGen und Sequenzausschnitte der mutierten Vektoren TLR4-T399I und TLR4-D299G.

Zusammenfassend demonstrierten die präparierten TLR4-Plasmide nach Restriktionsverdau das erwartete Insert und konnten somit in den Transfektionsversuchen eingesetzt werden (Daten nicht gezeigt).

3.2. Überprüfung der stabilen Transfektionseffizienz

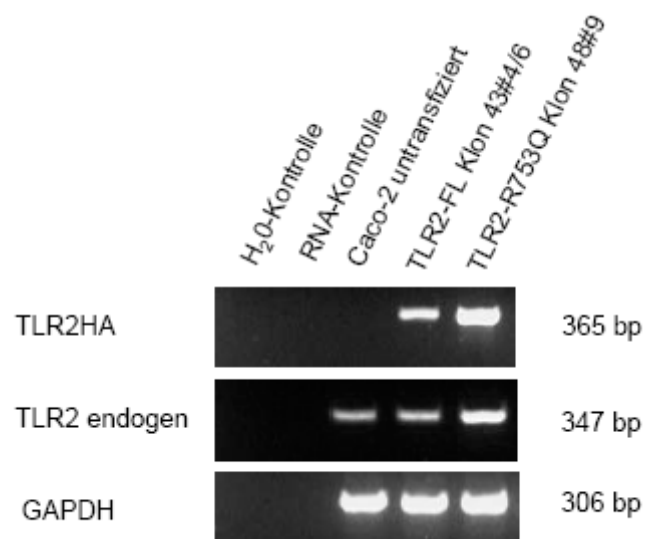
Durch die stabile Transfektion der verschiedenen Plasmide pUNO-TLR2-FL, pUNO-TLR2-R753Q, pUNO-TLR4-FL, pUNO-TLR4-T399I und pUNO-TLR4-D299G in die intestinale Epithelzelllinie Caco-2 entstanden verschiedene Zelllinien. Diese transgenen Zelllinien werden im folgenden als Klone bezeichnet.

Die verschiedenen TLR2-FL- und TLR4-FL-Klone, sowie die Klone der dazugehörigen Mutanten TLR2-R753Q, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden vergleichend sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene auf die Expression der Transgene untersucht. Dementsprechend wurde pro Rezeptor bzw. Mutante je ein Klon ausgewählt, der in allen weiteren Versuchen eingesetzt wurde.

3.2.1. TLR2-Klone

Insgesamt wurden 13 TLR2-FL- und 10 TLR2-R753Q-Zelllinien erzeugt. In mehreren Vorversuchen wurden alle Zelllinien auf Proteinebene auf ihre Expression des Transgens untersucht (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Zelllinien TLR2-FL 43#4/6 und TLR2-R753Q 48#9 mit semiquantitativer RT-PCR (Abb.3.1.A), Western-Blot (Abb.3.1.B) und Immunfluoreszenzfärbung (Daten nicht gezeigt) weiter untersucht.

A



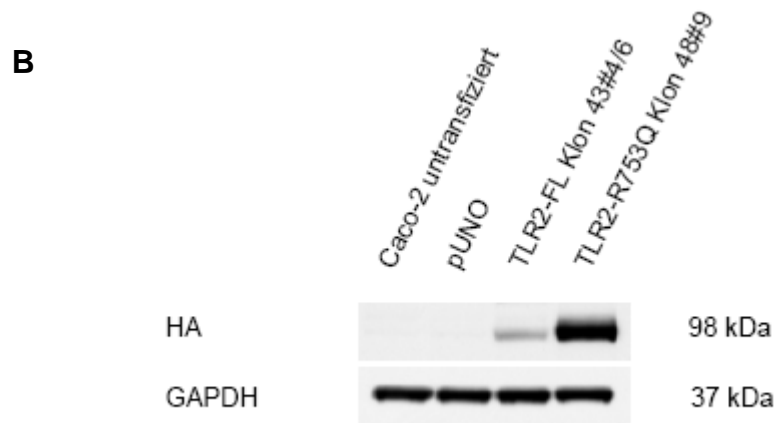


Abb.3.1. Gen- und Proteinexpression von TLR2HA, endogenem TLR2 und GAPDH in den TLR2-Klonen.

(A) Untransfizierte Caco-2-Zellen, transient mit pUNO transfizierte Caco-2-Zellen und die stabilen Klone TLR2-FL und TLR2-R753Q wurden auf mRNA-Expression von TLR2HA und endogenem TLR2 untersucht. GAPDH wurde zusätzlich als Kontrolle amplifiziert, um nachzuweisen, dass in die Reverse Transkription gleiche mRNA-Ausgangsmengen eingesetzt wurden. Die Wasser- und mRNA-Kontrollen dienten zur Überprüfung der reversen Transkription und RT-PCR auf Kontaminationen.

(B) Die Transfektionseffizienz wurde ebenfalls durch die Expression HA-markierter Proteine im Western-Blot nachgewiesen. Die Membran wurde im Anschluss als Ladungskontrolle mit einem anti-GAPDH Antikörper überprüft.

Die negativen Wasser- und mRNA-Kontrollen zeigten, dass sowohl die Reverse Transkription als auch die semiquantitative RT-PCR ohne DNA-Kontaminationen durchgeführt wurden. Gleiche Signalstärken in der GAPDH-PCR belegten den Einsatz gleicher cDNA Mengen in der Reversen Transkription und der RT-PCR. Der Nachweis von TLR2HA in beiden eingesetzten Zelllinien zeigte die erfolgreiche stabile Transfektion (Abb.3.1.A) auf mRNA-Ebene.

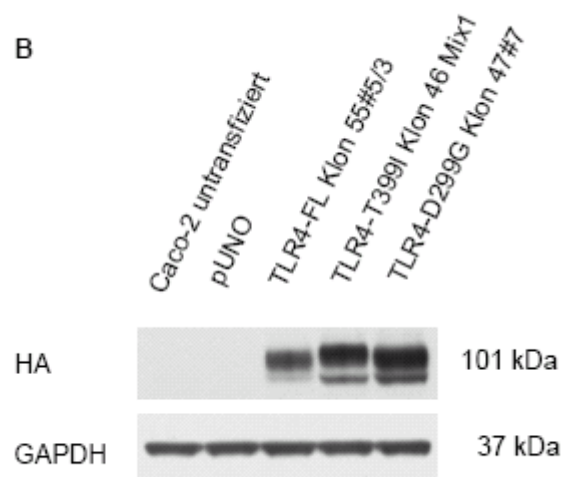
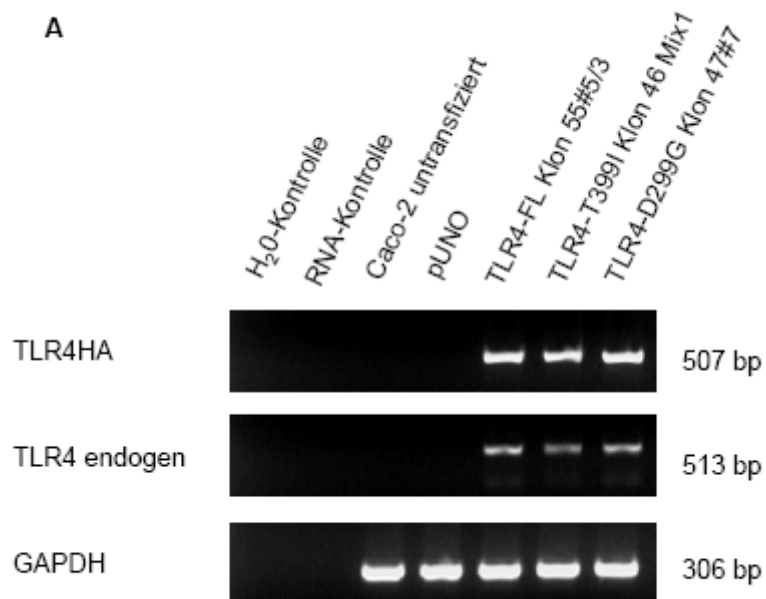
Die Expression der HA-markierten TLR2-Rezeptoren wurde auf Proteinebene im Western-Blot (Abb.3.1.B) und in Immunfluoreszenzfärbungen (Daten nicht gezeigt) bestätigt und ist vergleichbar mit Ergebnissen anderer Transfektionsstudien [121].

Im weiteren Verlauf der folgenden Untersuchungen wurden die beiden charakterisierten Zelllinien eingesetzt, wobei TLR2-FL 43#4/6 als TLR2-FL-Klon und TLR2-R753Q 48#9 als TLR2-R753Q-Klon bezeichnet wird.

3.2.2. TLR4-Klone

Insgesamt wurden 11 TLR4-FL-, 18 TLR4-T399I- und 7 TLR4-D299G-Zelllinien erzeugt und in verschiedenen Vorversuchen auf ihre HA-markierte TLR4-

Proteinexpression untersucht (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Vordaten wurden die Zelllinien TLR4-FL 55#5/3, TLR4-T399I 46 Mix 1 und TLR4-D299G 47#7 ausgewählt und mit semiquantitativer RT-PCR (Abb.3.2.A), Western-Blot (Abb.3.2.B) und Immunfluoreszenzfärbung (Abb.3.2.C) weiter charakterisiert.



C

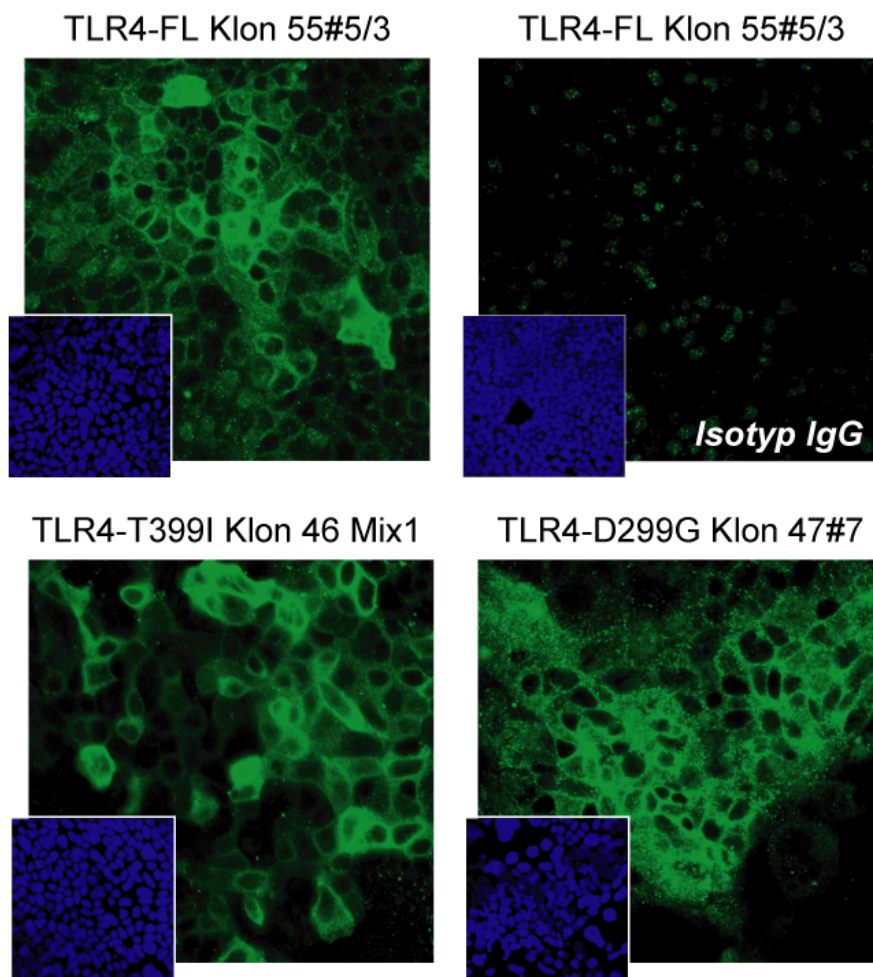


Abb.3.2. Überprüfung der Expression der Transgene der TLR4-Klone durch semiquantitative RT-PCR (A), Western-Blot (B) und Immunfluoreszenzfärbung (C).

(A) Untransfizierte Caco-2-Zellen, mit pUNO transient transfizierte Caco-2-Zellen, eine stabile TLR4-FL-Zelllinie (55#5/3), sowie je eine stabile Zelllinie der Mutanten TLR4-T399I (46 Mix 1) und TLR4-D299G (47#7) wurden mittels RT-PCR auf die Genexpression von TLR4HA und endogenem TLR4 untersucht. GAPDH wurde zusätzlich als Kontrolle amplifiziert, um nachzuweisen, dass in die Reverse Transkription gleiche mRNA-Ausgangsmengen eingesetzt wurden. Die negativen Wasser- und mRNA-Kontrollen belegten, dass sowohl die Reverse Transkription als auch die PCR ohne DNA-Kontaminationen durchgeführt wurden.

(B) Die Transfektionseffizienz wurde ebenfalls durch die Expression funktioneller, HA-markierter Proteine im Western-Blot nachgewiesen. Der Blot wurde im Anschluss als Ladungskontrolle mit einem anti-GAPDH Antikörper überprüft.

(C) Die Immunfluoreszenzfärbung für HA (AlexaFluor® 488, grün) bestätigte die vergleichbare Expression der Transgene der einzelnen TLR4-Klone. Die Zellkerne sind hier mit DAPI blau dargestellt. Die Isotypkontrolle (Maus IgG) demonstriert die spezifische Detektion des HA-Tags. Pro Zellklon ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt gezeigt, der unter gleichen Bedingungen aufgenommen worden ist (40x/1,3, Öl, Scan Zoom 1,0).

Der Nachweis von TLR4HA-mRNA in der semiquantitativen RT-PCR zeigte die erfolgreiche stabile Transfektion der TLR4-Zelllinien (Abb.3.2.A). Die mRNA-Expression von endogenem TLR4 war dabei in untransfizierten Caco-2-Zellen unter

diesen Zellkulturbedingungen sehr niedrig. In genomischer DNA untransfizierter Caco-2-Zellen ist TLR4 nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Die RT-PCR zeigte dabei keine Kontaminationen, da sowohl in der Wasser- als auch in der mRNA-Kontrolle keine Banden sichtbar waren. Den Einsatz gleicher cDNA-Mengen in der Reversen Transkription und der RT-PCR belegten gleiche Signalstärken in der GAPDH-PCR.

Die Expression der Transgene aus der RT-PCR wurde auf Proteinebene im Western-Blot (Abb.3.2.B) und in Immunfluoreszenzfärbungen (Abb.3.2.C) bestätigt. Dabei demonstrierten die stabil transfizierten TLR4-Zelllinien eine Doppelbande, die wahrscheinlich durch Glykosylierung des Rezeptors zustande kam [40]. Die HA-markierten, stabil transfizierten TLR4-Rezeptoren waren in der Immunfluoreszenzfärbung hauptsächlich an der Zelloberfläche lokalisiert, welches der nativen Morphologie von endogenem TLR4 entspricht [23].

Zusammenfassend war die HA-Expressionsstärke in der RT-PCR, im Western-Blot und in den Immunfluoreszenzfärbungen zwischen den drei ausgewählten Klonen vergleichbar.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die TLR4-FL-Zelllinie 55#5/3 als TLR4-FL-Klon, TLR4-T399I-Zelllinie 46 Mix1 als TLR4-T399I-Klon und TLR4-D299G Zelllinie 47#7 als TLR4-D299G-Klon bezeichnet.

Mit dem leeren Grundvektor pUNO transient transfizierte Caco-2-Zellen wurden aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen im weiteren Verlauf der Arbeit nicht weiter eingesetzt.

3.3. Untersuchungen zum Einfluss von TLR2 und der TLR2-Variante R753Q auf die Homöostase und Restitution der intestinalen Epithelbarriere

Die funktionelle Intaktheit der intestinalen epithelialen Immunbarriere ist von entscheidender physiologischer Bedeutung zur effizienten Aufrechterhaltung der mukosalen Homöostase. Differenzierung und Permeabilität, Proliferation, metabolische Aktivität, Zell-Zell-Kommunikation und Restitution spielen gemeinsam eine entscheidende Rolle in der Regulation der Barriereintegrität des intestinalen Epithels. Die modulierenden Einflüsse von TLR2 und der Colitis ulcerosa-relevanten

Variante TLR2-R753Q auf diese zentralen Mechanismen der intestinalen epithelialen Barrierefunktion wurden im Folgenden hier untersucht.

3.3.1. Differenzierung

Caco-2-Zellen können *in vitro* in ein geschlossenes, funktionelles Epithel ausdifferenzieren. Die Permeabilität ist dabei ein Maß für die Barriereintegrität des Epithels. Das Ausmaß der basalen Differenzierung bzw. die Veränderung der Permeabilität wurden durch Messung des transepithelialen Widerstandes (TER) nachgewiesen. Dabei steigt der TER mit der Ausdifferenzierung der Zellen und zunehmender Stabilität des Epithels an.

TLR2 spielt eine wichtige Rolle dabei, die Barrierefunktion aufrechtzuerhalten. Stimulation mit dem spezifischen TLR2-Liganden PCSK stärkt die Barriereintegrität und vermindert die Barrierepermeabilität in akuter Colitis [24] [28].

Im Folgenden wurde der Einfluss von TLR2-FL bzw. der TLR2-R753Q-Mutation auf 1) die basale Ausdifferenzierung und 2) auf akute Veränderungen der Permeabilität in An- bzw. Abwesenheit des spezifischen TLR2-Liganden PCSK in intestinalen Epithelzellen, untersucht.

Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR2-Klone TLR2-FL und TLR2-R753Q wurden in drei Wochen Kultur auf Zellkultureinsätzen ausdifferenziert. Der TER der einzelnen Zellklone, in An- bzw. Abwesenheit des spezifischen TLR2-Liganden PCSK, wurde anhand des transepithelialen Widerstandes (TER) bestimmt und ausgewertet. Die Zellen wurden sowohl apikal als auch basal mit 20µg/ml PCSK stimuliert und der TER nach 30, 60, 120 und 180 Minuten gemessen.

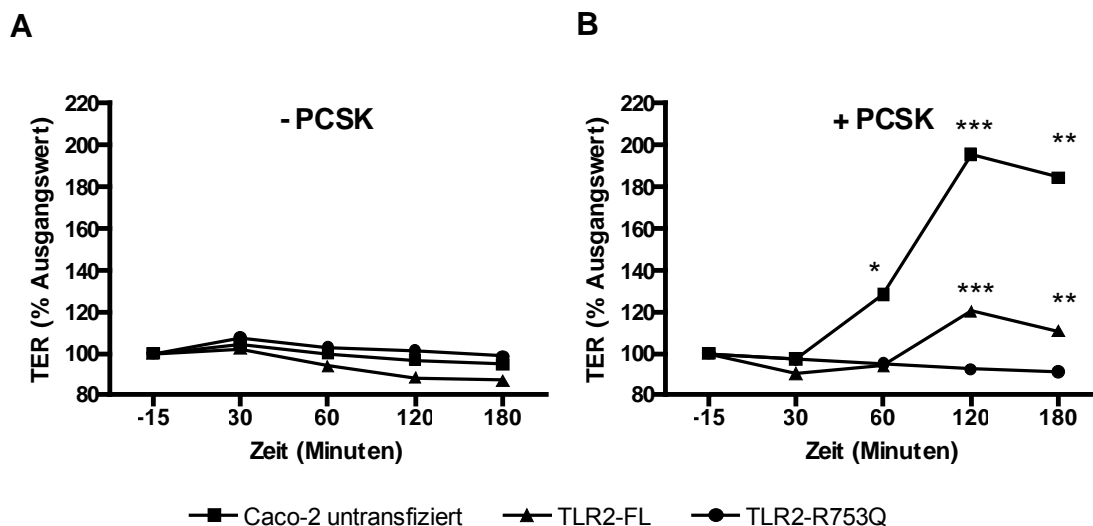


Abb.3.3. Funktioneller Nachweis des Differenzierungsgrads der TLR2-Klone basal (A) und nach Stimulation mit PCSK (B). Untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR2-FL-Klon, sowie die TLR2-R753Q-Mutante wurden in drei Wochen Kultur auf Zellkultureinsätzen ausdifferenziert. Der transepitheliale Widerstand (TER) wurde unstimuliert (A), bzw. nach 30, 60, 120 und 180 Minuten apikaler und basaler Stimulation mit 20µg/ml PCSK (B) gemessen. Der gemessene TER 15 Minuten vor Start der Stimulation wurde als 100%iger Ausgangswert gesetzt und alle weiteren Werte auf diesen bezogen. Die Graphen zeigen ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche, wobei die Proben jeweils im Triplikat angesetzt wurden und dann der Mittelwert gebildet wurde. Statistische Signifikanz zwischen Caco-2-Zellen und TLR2-FL-Zellen bzw. zwischen TLR2-FL- und TLR2-R753Q-Zellen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Basal waren sich die verschiedenen Zellklone im Differenzierungsgrad bzw. in der Permeabilität der unstimulierten Klone ähnlich. Wurden die Zellen jedoch mit dem spezifischen TLR2-Liganden PCSK stimuliert, so zeigten die Klone unterschiedliche Reaktionen. Wie vor Kurzem gezeigt [24], reagierten untransfizierte Caco-2-Zellen nach 120 Minuten Stimulation mit einem Anstieg des transepithelialen Widerstandes um fast 100%. Der TLR2-FL-Klon reagierte auf die PCSK-Stimulation mit einem Anstieg des TER um ca. 20%. Im Gegensatz dazu reagierte der TLR2-R753Q-Klon nicht auf PCSK und zeigte keine Änderung des basalen TER. Der Unterschied zwischen dem TLR2-FL- und dem TLR2-R753Q-Klon nach PCSK-Stimulation war statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Ein weiterer Anhaltungspunkt für den Differenzierungsgrad von IEC ist die Expression des Enzyms Sucrase-Isomaltase (SI), das mit zunehmender Differenzierung von Caco-2-Zellen höher exprimiert wird. Die SI-Genexpression in Caco-2-Zellen und den TLR2-Klonen wurde mit quantitativer Realtime RT-PCR analysiert (Abb.3.4.).

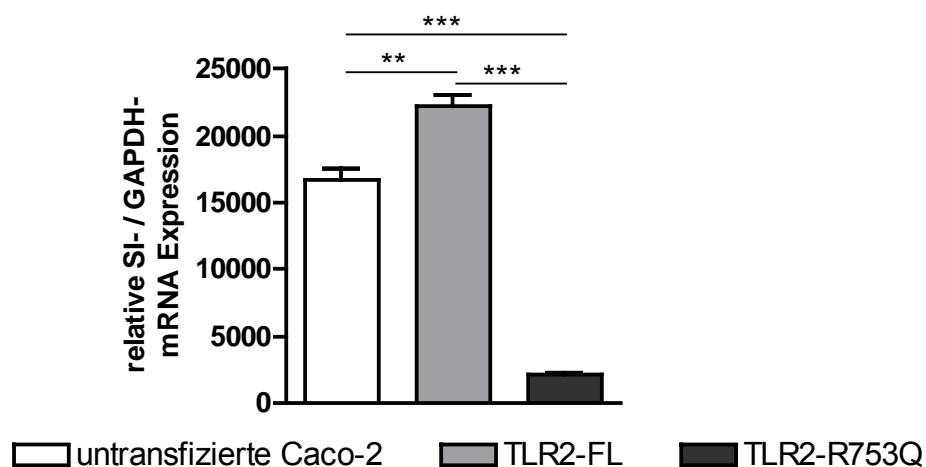


Abb.3.4. Sucrase-Isomaltase (SI) Genexpression in den TLR2-Klonen. Untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR2-FL- und der TLR2-R753Q-Klon wurden nach 8 Tagen Kultur auf die mRNA-Expression von SI in quantitativen Realtime PCRs untersucht. Die Kopienzahl von SI wurde für die

Auswertung auf das "housekeeping-Gen" GAPDH bezogen und als relative Konzentration angegeben. Die Grafik fasst fünf unabhängige PCR-Läufe zusammen, wobei die Caco-2- und TLR2-FL-Proben im Sechsfachansatz und die TLR2-R753Q-Proben im Triplikat eingesetzt wurden. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen und dem TLR2-FL-Klon demonstrierte der TLR2-R753Q-Klon nach 8 Tagen Kultur eine signifikant niedrigere SI-Genexpression. Demzufolge könnte der TLR2-R753Q-Klon ein verzögertes Ausdifferenzierungsverhalten im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen und dem TLR2-FL-Klon besitzen. Auch nach dreiwöchiger Ausdifferenzierung auf Zellkultureinsätzen stieg die SI-mRNA-Expression im TLR2-R753Q-Klon kaum an (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst wirkte sich die Überexpression von TLR2 positiv auf das Differenzierungsvermögen von Caco-2-Zellen aus. Im Gegensatz dazu zeigte der TLR2-R753Q-Klon eine verzögerte Differenzierung und reagierte nicht auf Stimulation mit PCSK.

3.3.2. Proliferation

Um die Homöostase der intestinalen epithelialen Barriere aufrechtzuerhalten, ist eine kontinuierliche Zellproliferation notwendig.

Die TLR2-Klone wurden dabei hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens in BrdU-ELISAs charakterisiert. Hierfür wurden die Klone mit gleichen Zellzahlen (10.000 Zellen pro 100 μ l) ausplattiert und zu drei verschiedenen Zeitpunkten (19h, 43h, 67h) die Proliferation der Zellen durch den BrdU-Einbau quantifiziert.

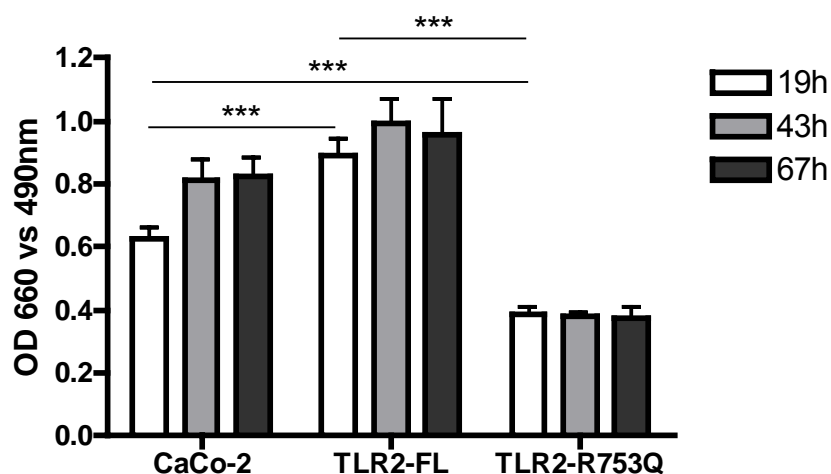


Abb.3.5. Proliferationsverhalten der TLR2-Klone. Untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR2-FL- und TLR2-R753Q-Klon wurden mit gleichen Zellzahlen (10.000 Zellen pro 100 μ l) ausplattiert und die

Proliferation durch den Einbau des Basenanalogs BrdU nach 19h, 43h und 67h in einem ELISA bestimmt. Die Abbildung präsentiert die Zusammenfassung zweier unabhängiger Experimente, in denen die Zellen im Sechsfachansatz ausplattiert wurden. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistische Signifikanz ist exemplarisch für die 19h Messwerte gezeigt, wobei $p < 0,001$.

Im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen und dem TLR2-FL-Klon zeigte der TLR2-R753Q-Klon eine signifikant verminderte Proliferation ($p < 0,001$) zu allen drei gemessenen Zeitpunkten. Der TLR2-FL-Klon demonstrierte im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen eine tendenziell gesteigerte Proliferation an den drei gemessenen Zeitpunkten, die jedoch nur zum 19h-Zeitpunkt signifikant ($p < 0,001$) war.

3.3.3. Metabolische Aktivität

Zusätzlich zur Wachstumsanalyse im BrdU-ELISA wurden die Klone im MTS-Assay auf ihre metabolische Aktivität untersucht. Diese spiegelt neben der Proliferationsfähigkeit auch den Stoffwechsel durch den Umsatz eines Tetrazoliumsals wider. Die Versuche wurden parallel zu den Proliferationsversuchen ausplattiert und geerntet.

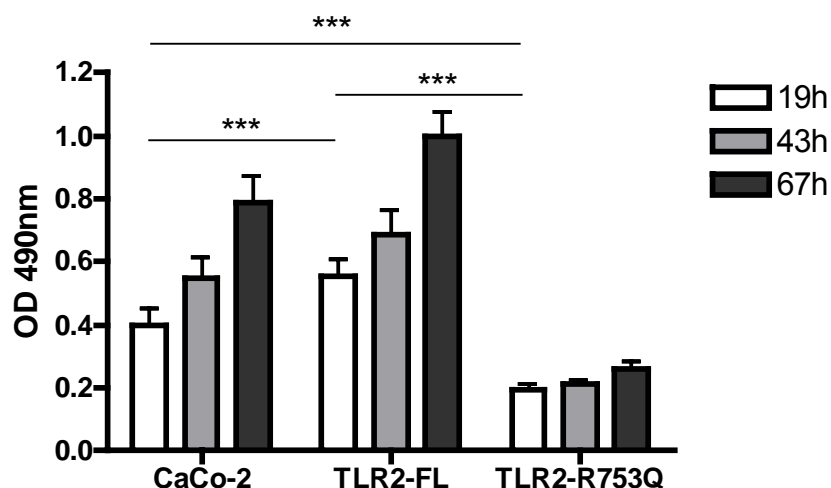


Abb.3.6. Metabolische Aktivität der TLR2-Klone. Untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR2-FL- und TLR2-R753Q-Klon wurden mit gleichen Zellzahlen (10.000 Zellen pro 100 μ l) ausplattiert und die metabolische Aktivität nach 19h, 43h und 67h im MTS-Assay bestimmt. Die Abbildung präsentiert die Zusammenfassung zweier unabhängiger Experimente, in denen die Zellen im Sechsfachansatz ausplattiert wurden. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistische Signifikanz ist exemplarisch für die 19h Messwerte gezeigt, wobei $p < 0,001$.

Der TLR2-R753Q-Klon demonstrierte eine signifikante Verminderung der metabolischen Aktivität nach 19h, 43h und 67h, sowohl im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen als auch zum TLR2-FL-Klon ($p < 0,001$).

Untransfizierte Caco-2-Zellen und der TLR2-FL-Klon zeigten eine ähnliche metabolische Aktivität, wobei die Überexpression von TLR2 einen tendenziell, aber nicht signifikant erhöhten Stoffwechsel der Zellen zur Folge hatte. Im Kulturverlauf stieg die metabolische Aktivität von untransfizierten Caco-2-Zellen und des TLR2-FL-Klons deutlich an, im TLR2-R753Q-Klon hingegen nur minimal.

3.3.4. Zell-Zell-Kommunikation

Die Zell-Zell-Kommunikation dient dem para- und intrazellulären Austausch von Molekülen über "*gap junctions*" und stellt einen Schlüsselmechanismus zur Aufrechterhaltung der intestinalen epithelialen Homöostase dar [49] [100].

3.3.4.1. Gen- und Proteinexpression von Cx43 und ZO-1

Connexin 43 (Cx43) ist ein integrales Membranprotein in "*gap junctions*" und damit ein Hauptmolekül der Zell-Zell-Kommunikation [102].

Um herauszufinden, ob eine TLR2-Dysfunktion die Zell-Zell-Kommunikation beeinflusst, wurde der Zusammenhang zwischen den TLR2-Klonen und der Cx43-Expression mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR (Abb.3.7.) und Western-Blot-Verfahren (Abb.3.8.) untersucht.

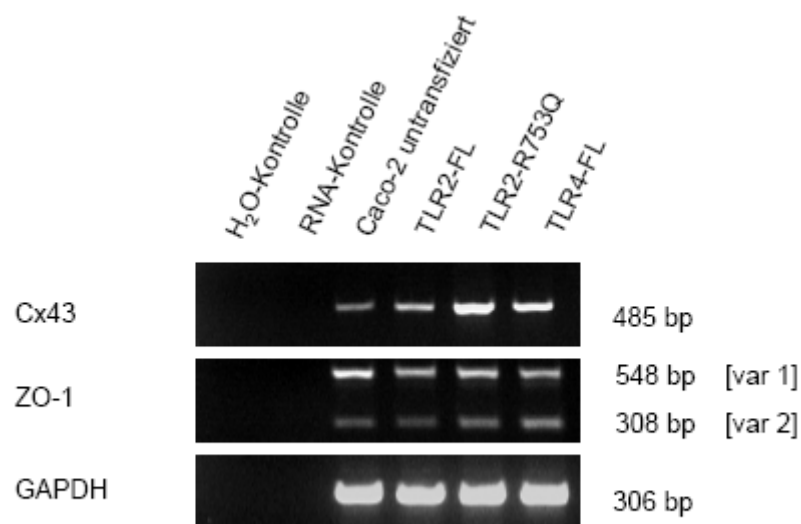


Abb.3.7. Genexpression von Cx43 und ZO-1. Untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR2-FL-Klon und der TLR2-R753Q-Klon wurden in einer semiquantitativen RT-PCR auf die Expression von Cx43 und ZO-1 im Vergleich zu GAPDH untersucht. Der TLR4-FL-Klon ist eine weitere Kontrolle, H₂O ist eine Kontaminationskontrolle und die mRNA-Kontrolle dient zur Überprüfung der Ausgangs-mRNA für die Reverse Transkription. GAPDH zeigt den Einsatz gleicher mRNA Mengen in die Reverse Transkription und gleicher cDNA Mengen in die RT-PCR. Var1 bzw. 2 stehen für die beiden

Transkriptvarianten von ZO-1. Die Abbildung zeigt exemplarisch ein Ergebnis von mindestens n = 2. Veröffentlicht in [49].

Da in der Wasser- und mRNA-Kontrolle keine Banden sichtbar waren und die GAPDH-Banden der verschiedenen Proben eine vergleichbare mRNA-Signalstärke aufwiesen, ist die RT-PCR ohne Kontaminationen und mit der gleichen Menge cDNA als Ausgangsmaterial gelaufen. Cx43-mRNA zeigte im Vergleich die höchste Expression in dem TLR2-R753Q-Klon, gefolgt vom TLR4-FL- und TLR2-FL-Klon und untransfizierten Caco-2-Zellen. Der TLR4-FL-Klon diente hier als eine weitere Kontrolle.

Als eine zusätzliche Kontrolle wurde auch die Gen- und Proteinexpression des "*tight junction*" Gens ZO-1 (Zonula occludens-1) untersucht. ZO-1 kommt ausschließlich auf der zytoplasmatischen Seite von "*tight junctions*" vor und hat zwei Transkript-Varianten (Var1 und Var2), die verschiedene Isoformen kodieren [124].

ZO-1-Var1-mRNA war in Caco-2-Zellen geringfügig stärker exprimiert als in den beiden TLR2-Klonen und dem TLR4-FL-Klon. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch eine quantitative Realtime PCR bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde die Protein-Expression von Cx43 und ZO-1 mittels Western-Blots analysiert.

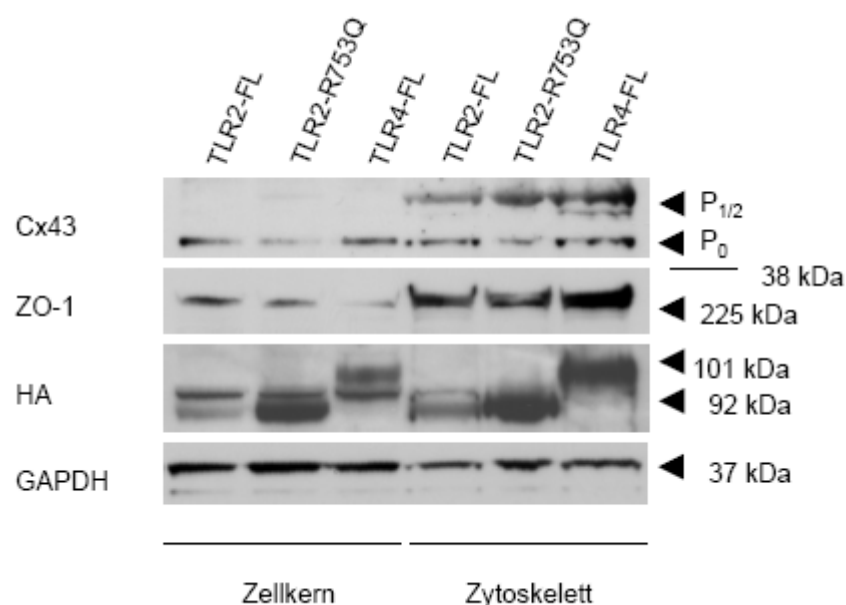


Abb.3.8. Proteinexpression von Cx43, ZO-1, HA und GAPDH in fraktionierten TLR2-FL-, TLR2-R753Q- und TLR4-FL-Zellen. Die Zellen wurden mit dem Zell-Fraktionierungskit lysiert und die Fraktionen des Zellkerns und des Zytoskeletts in einen Western-Blot eingesetzt. Neben der Cx43-Proteinexpression wurde des Weiteren ZO-1 untersucht. Der Nachweis von HA dient als Kontrolle der

stabilen Transfektion und ein Reproben mit einem anti-GAPDH Antikörper als Ladungskontrolle des Gels. Dieser Blot zeigt exemplarisch ein Ergebnis von n = 2. Veröffentlicht in [49].

Auf Proteinebene zeigte sich für Cx43 jedoch ein anderes Bild. Cx43 wird zunächst als P_0 -Isoform gebildet und dann während des Transports durch das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi Apparat an die Plasmamembran in die Isoformen $P_{1/2}$ konvertiert [122]. Im Gegensatz zum TLR2-FL-Klon war im TLR2-R753Q-Klon die P_0 -Isoform des Cx43-Proteins nur sehr schwach detektierbar, sowohl im Bereich des Zellkerns als auch des Zytoskeletts (Abb.3.8.). Diese verminderte Expression der P_0 -Isoform im TLR2-R753Q-Klon wurde nicht durch eine vermehrte Expression der $P_{1/2}$ -Isoformen oder eine Verlagerung des Proteins in andere Zellkompartimente (Zytosol, Membranen und Organellen) ausgeglichen. Dies lässt darauf schließen, dass das Cx43-Protein in dem TLR2-R753Q-Klon posttranslational abgebaut wird. Die erhöhte mRNA-Expression (Abb.3.7.) von Cx43 im TLR2-R753Q-Klon lässt sich möglicherweise als Kompensationsmechanismus auf einen übermäßigen Abbau des Cx43-Proteins erklären.

Die ZO-1-Proteinexpression wies ein vergleichbares Bild zur mRNA-Expression auf. Der TLR2-FL-Klon und der TLR2-R753Q-Klon exprimierten ZO-1-Protein in ähnlichen Mengen, erwartungsgemäß vorwiegend im Zytoskelett (Abb.3.8.). Die GAPDH-Expression bestätigte eine gleichmäßige Beladung der Spuren des Gels und der Nachweis von HA in allen Zellen und ihren Kompartimenten bestätigte die Expression der Transgene in den verwendeten Zellen.

Des Weiteren wurde das Expressionsmuster von Cx43 und ZO-1 in Immunfluoreszenzfärbungen morphologisch analysiert (Abb.3.9.).

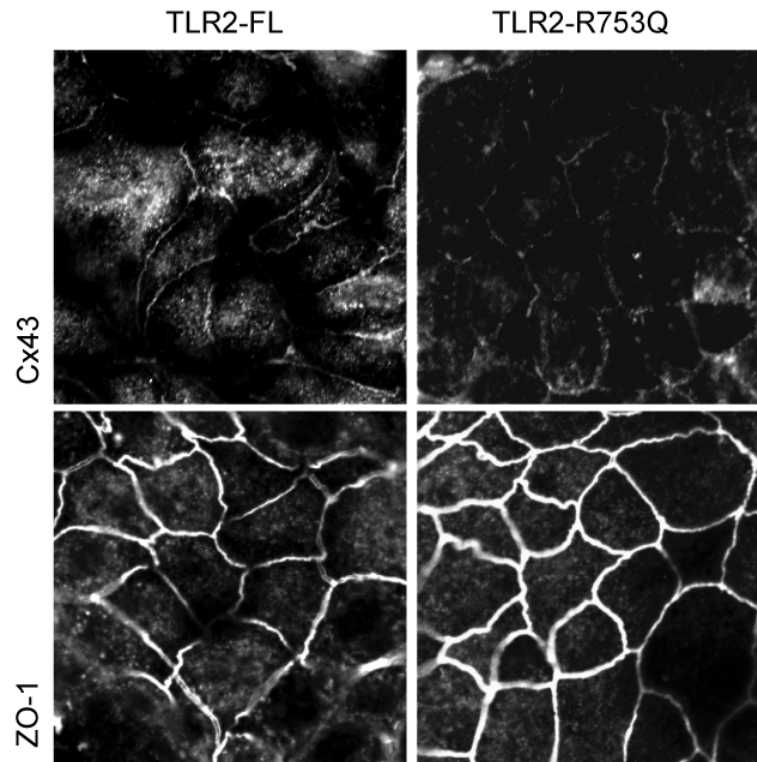


Abb.3.9. Proteinexpressionsmuster von Cx43 und ZO-1 in einer Immunfluoreszenzfärbung. Der TLR2-FL- und der TLR2-R753Q-Klon wurden in indirekten Immunfluoreszenzfärbungen für Cx43 (FITC, weiß, obere Reihe) und ZO-1 (Cy5, weiß, untere Reihe) angefärbt und am konfokalen Laser Scanning Mikroskop unter identischen Bedingungen morphologisch ausgewertet (63x/1,4, Öl, Scan Zoom 2.0). Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Ausschnitt zweier unabhängiger Versuche. Veröffentlicht in [49].

Im TLR2-FL-Klon sowie in untransfizierten Caco-2-Zellen war das Cx43-Protein perinukleär und an interzellulären Kontaktpunkten, den *"gap junctions"*, lokalisiert. Im TLR2-R753Q-Klon war Cx43 auf Proteinebene kaum detektierbar, nur als schwaches Fluoreszenzsignal an einigen Zell-Zell-Kontaktpunkten. Eine zellkernnahe Expression des Proteins war nicht nachweisbar.

Im Gegensatz dazu war die Expression und Lokalisation von ZO-1 an den Zellrändern des TLR2-R753Q-Klons vergleichbar zum TLR2-FL-Klon.

Zusammengefasst zeigte der TLR2-R753Q-Klon einen spezifischen, posttranslationalen Verlust des Cx43-Proteins, was eine gestörte Zell-Zell-Kommunikation zur Folge haben könnte.

3.3.4.2. Funktioneller Nachweis der Zell-Zell-Kommunikation nach Verwundung

Der *"Scrape-wounding Assay"* bietet die Möglichkeit, den Verlust des Cx43-Proteins im TLR2-R753Q-Klon und seinen Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation funktionell zu untersuchen. Hierbei wurden konfluente Monolayer des TLR2-FL- und

TLR2-R753Q-Klons in der Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffes "*Lucifer yellow*" verwundet. Die interzelluläre Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffes nach Verwundung stellt ein Maß für den Kopplungsgrad des epithelialen Zellverbandes, bzw. die relative Bildung geöffneter Zell-Zell-Kanäle ("*gap junctions*") dar.

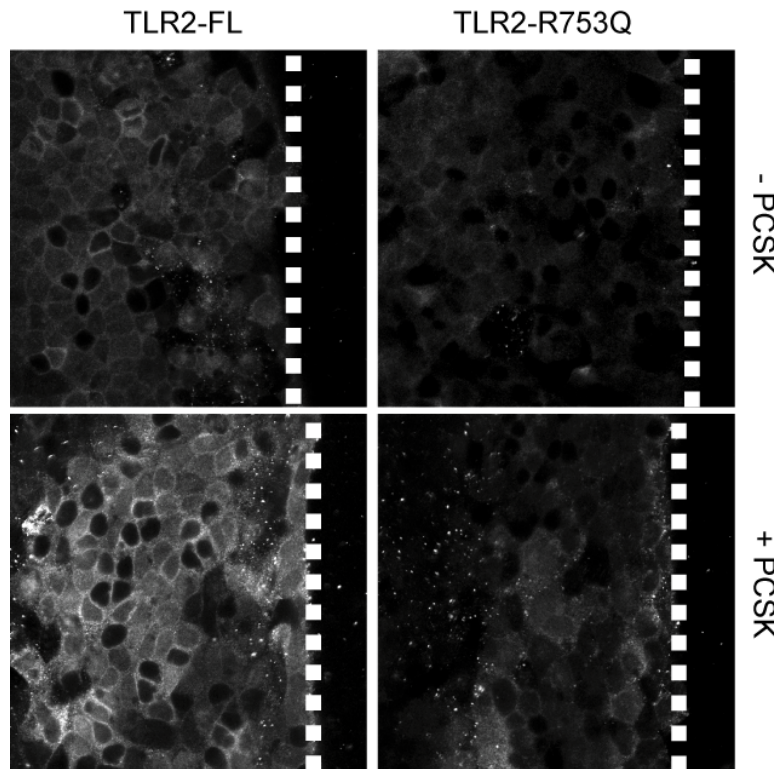


Abb.3.10. Funktioneller Nachweis der Zell-Zell-Kommunikation nach Verwundung. Konfluente, unstimulierte (obere Reihe) oder mit 20µg/ml PCSK-vorstimulierte (untere Reihe) Monolayer des TLR2-FL- (linke Spalte) und des TLR2-R753Q-Klons (rechte Spalte) wurden in Anwesenheit des fluoreszierenden "*Lucifer yellow*"-Farbstoffes verwundet. Der Weitertransport des Farbstoffes (FITC, weiß) wurde nach 8 Minuten am Laser Scanning Mikroskop ausgewertet (40x/1,3, Öl, Scan Zoom 1,0). Die gezeigten Ausschnitte sind repräsentative Beispiele der Wundränder, die als weiße gestrichelte Linien dargestellt sind (n = 3). Veröffentlicht in [49].

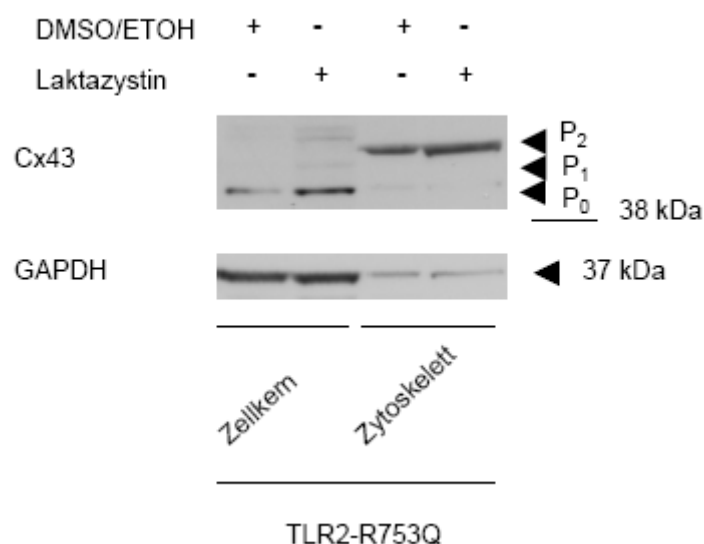
Basal war die niedrige Aufnahme von "*Lucifer yellow*" zwischen verwundeten Monolayern des TLR2-FL- und TLR2-R753Q-Klons vergleichbar. Eine Stimulation mit PCSK (20µg/ml für 8 Minuten) bewirkte jedoch eine signifikante Erhöhung der Zell-Zell-Kommunikation im TLR2-FL-Klon nach Verwundung. Im Gegensatz dazu demonstrierten verwundete Zellen des TLR2-R753Q-Klons in diesem Kommunikationstest nach PCSK-Stimulation keinen Weitertransport des Farbstoffes. Zusammenfassend zeigte die Cx43-defiziente TLR2-R753Q-Mutante in diesem funktionellen Zell-Zell-Kommunikationstest sowohl basal als auch nach PCSK-Stimulation keine interzelluläre Kommunikation.

3.3.4.3. Einfluss des Proteasoms auf den Abbau des Cx43-Proteins im TLR2-R753Q-Klon

Das Cx43-Protein wird in der Zelle u.a. durch das Proteasom abgebaut [97]. Das Proteasom ist ein Proteinkomplex, der aus mehreren Untereinheiten besteht. Proteine, die abgebaut werden sollen, werden in einem mehrstufigen enzymatischen Prozess mit Ubiquitin markiert. Dieses wird dann von einer Untereinheit des Proteasoms erkannt und das Zielprotein im Proteasom abgebaut. Vor Kurzem wurde eine Verbindung des TLR2-Signalweges mit der Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges nachgewiesen [190].

Im Vergleich zum TLR2-FL-Klon war Cx43 im TLR2-R753Q-Klon auf Proteinebene kaum nachweisbar (Abb.3.8.), aber auf mRNA-Ebene konsekutiv höher exprimiert (Abb.3.7.). Dies könnte auf einen gestörten, übermäßigen Abbau des Cx43-Proteins durch das Proteasom im TLR2-R753Q-Klon hinweisen und wurde durch Inhibition des Proteasoms mit Laktazystin untersucht. Laktazystin wirkt spezifisch inhibitorisch auf das Proteasom und beeinflusst nicht die Proteinsynthese [51].

A



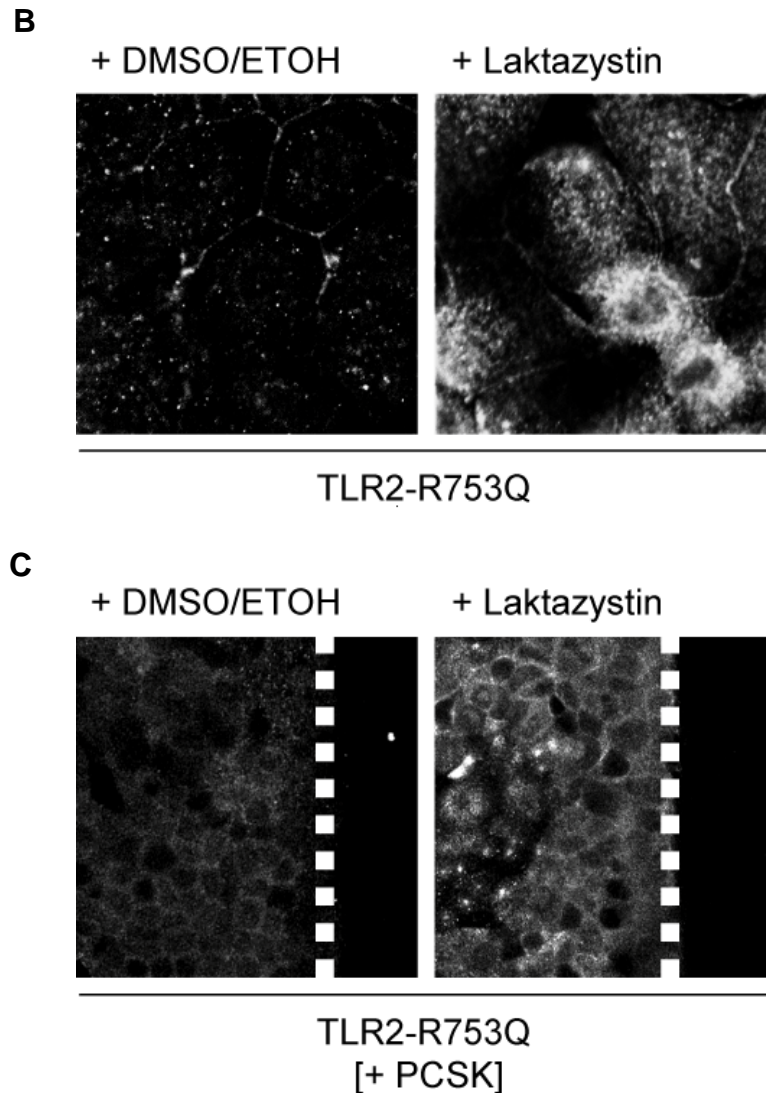


Abb.3.11. Inhibition des Proteasoms verhindert Cx43-Abbau im TLR2-R753Q-Klon. Der TLR2-R753Q-Klon wurde für 60min mit 30µM des Proteasominhibitors Laktazystin bzw. der Lösungsmittelkontrolle Dimethyl Sulfoxid/Ethanol (1:1 DMSO/EtOH) inkubiert.

(A) Anschließend wurden die Zellen mit dem Zellfraktionierungskit lysiert. Die Fraktionen Zellkern und Zytoskelett wurden mit gleichen Proteinmengen in einen Western-Blot für Cx43 eingesetzt, der im Anschluss als Ladungskontrolle mit anti-GAPDH überprüft wurde.

(B) Cx43 (FITC, weiß) wurde in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (63x/1,4, Öl, Scan Zoom 2,0).

(C) Zusätzlich wurden die Zellen mit 20µg/ml PCSK stimuliert und in den Verwundungsversuch eingesetzt. Die Ausbreitung von "Lucifer yellow" (FITC, weiß) wurde am Laser Scanning Mikroskop ausgewertet (40x/1,3, Öl, Scan Zoom 1,0). Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der verwundeten Stelle, wobei die weiße gestrichelte Linie den Wundrand abgrenzt (n = 2). Veröffentlicht in [49].

Bereits eine einstündige Inkubation mit dem Proteasom-Inhibitor Laktazystin konnte im Gegensatz zur Lösungsmittelkontrolle DMSO/EtOH den Abbau des Cx43-Proteins im TLR2-R753Q-Klon verhindern. Dabei führte dies zu einer signifikant erhöhten Proteinexpression der P₀-Isoform im Zellkernkompartiment und einer geringen

Steigerung der P₂-Expression im Zytoskelett (Abb.3.11.A) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO/EtOH.

In der Immunfluoreszenzfärbung wurde dies bestätigt und morphologisch charakterisiert. Die Laktazystin-Vorinkubation führte im TLR2-R753Q-Klon im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO/EtOH zu einer deutlich höheren Cx43-Protein-Expression. Die Cx43-Lokalisation in diesen Zellen war vergleichbar zum Phänotyp des TLR2-FL-Klons (Abb.3.9.) perinukleär und an Zell-Zell-Kontakten (Abb.3.11.B).

Auch funktionell hatte der verminderte Cx43-Protein-Abbau Auswirkungen im TLR2-R753Q-Klon. Die einstündige Vorinkubation mit dem Proteasominhibitor und eine zusätzliche Stimulation mit PCSK bewirkte im TLR2-R753Q-Klon eine signifikante Erhöhung der Zell-Zell-Kommunikation nach Verwundung (Abb.3.11.C). Diese war vergleichbar zum TLR2-FL-Klon (Abb.3.10.).

Zusätzlich wurde eine mögliche Fehlregulation des Endoplasmatischen Retikulums (ER) im TLR2-R753Q-Klon im Western-Blot untersucht.

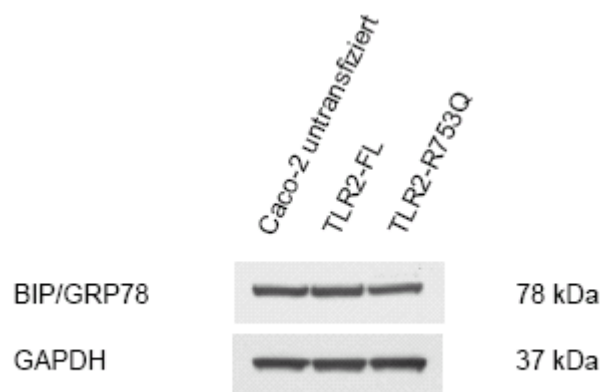


Abb.3.12. Proteinexpression von BIP/GRP78 in den TLR2-Klonen. Totale Zelllysate von untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR2-Klonen TLR2-FL und TLR2-R753Q wurden im Western-Blot auf die Proteinexpression von BIP/GRP78 untersucht. Überprüfen des Blots mit anti-GAPDH diente als Ladungskontrolle. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western-Blot von zwei unabhängigen Versuchen.

Die Proteinexpression von BIP/GRP78 (*Binding Protein/Glukose-regulated Protein* 78), eines der Hauptproteine des Endoplasmatischen Retikulums, war in untransfizierten Caco-2-Zellen und den beiden TLR2-Klonen vergleichbar (Abb.3.12.). Dabei zeigte GAPDH den Einsatz gleicher Proteinmengen in den

Western-Blot. Dementsprechend konnte eine Beteiligung des ER am vermehrten Abbau des Cx43-Proteins und "ER-Stress" in den Zellen ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend verhinderte die Inhibition des Proteasoms im TLR2-R753Q-Klon den übermäßigen Protein-Abbau von Cx43 und stellte morphologisch und funktionell den Phänotyp des TLR2-FL-Klons her. Demzufolge schien Cx43 essentiell notwendig für die TLR2-abhängige Zell-Zell-Kommunikation zu sein. Eine zusätzliche Fehlregulation des ER im TLR2-R753Q-Klon konnte ausgeschlossen werden.

3.3.5. Restitution

Die Restitution ist ein weiterer wichtiger Mechanismus der intestinalen Wundheilung. "Trefoil Factor 3 (TFF3)" ist ein Hauptregulator in der intestinalen epithelialen Wundheilung und vermittelt dabei die Migration [169].

Die TLR2-R753Q-Mutation wurde vor Kurzem *in vivo* mit einem schweren Colitis ulcerosa-Phänotyp, der sog. Pancolitis, assoziiert [134]. In den vorherigen Versuchen wies der TLR2-R753Q-Klon funktionelle Defizite in Wundheilungsmechanismen (Proliferation, Zell-Zell-Kommunikation) auf. Wir haben zuvor gezeigt, dass eine Stimulation von TLR2 zur Induktion der TFF3-Synthese in humanen und murinen Becherzellen führt [136].

3.3.5.1. Peptidexpression von "TFF3"

Ob zusätzlich auch die Restitution über TFF3 in der Mutante verändert war, wurde zunächst über die intrazelluläre Peptidproduktion und anschließende Sekretion von TFF3 in den TLR2-Klonen untersucht.

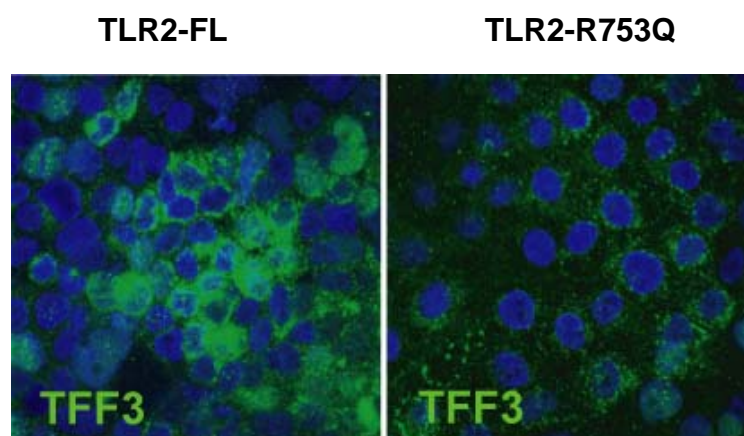


Abb.3.13. Intrazelluläre Peptidproduktion von TFF3 im TLR2-FL- und TLR2-R753Q-Klon. Der TLR2-FL- und TLR2-R753Q-Klon wurde in einer Immunfluoreszenzfärbung auf die intrazelluläre Produktion von TFF3 angefärbt. TFF3 ist hier grün (FITC) dargestellt und die Zellkerne blau (DAPI). Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der gefärbten Zellen (63x/1,3, Öl, Scan Zoom 1,0) aus zwei unabhängig durchgeführten Versuchen. Veröffentlicht in [136].

Wie in Abb.3.13. gezeigt, führt die Überexpression von TLR2-FL in Caco-2-Zellen zu einer konstitutiven Peptidsynthese von TFF3. Im Vergleich dazu war im TLR2-R753Q-Klon in der Immunfluoreszenzfärbung jedoch fast keine TFF3-Produktion nachweisbar.

Im Western-Blot wurde zusätzlich die Sekretion des TFF3-Peptids in den Zellkulturüberstand von untransfizierten Caco-2-Zellen, dem TLR2-FL- und TLR2-R753Q-Klon untersucht.

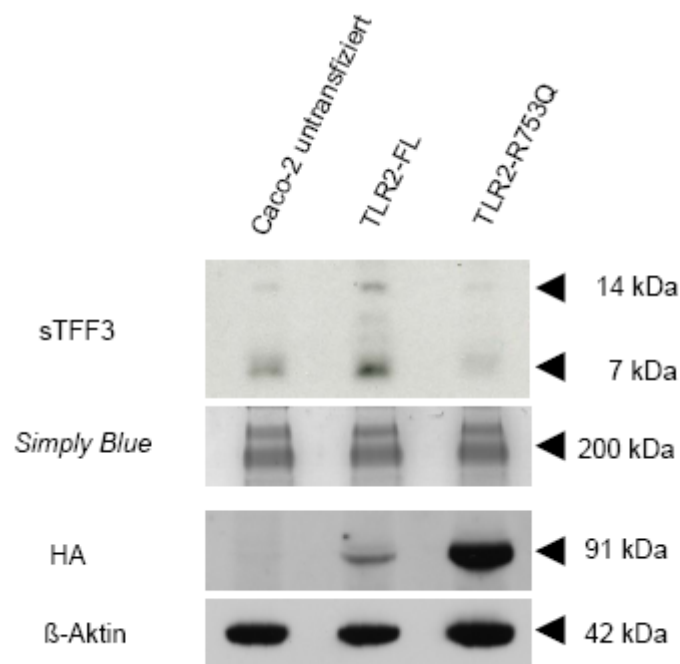


Abb.3.14. Sekretion von TFF3. Konditioniertes Medium untransfizierter Caco-2-Zellen, des TLR2-FL und des TLR2-R753Q Klon wurde aufkonzentriert und im Western-Blot für sekretiertes TFF3 (sTFF3) eingesetzt. *Simply Blue* zeigte hier die gleiche Beladung des zugehörigen Gels. Zusätzlich wurden Zelllysate der Zellen in einen weiteren Western-Blot eingesetzt, in dem mit einem HA-Antikörper die stabile Expression der Transgene nachgewiesen wurde. Als Ladungskontrolle wurde im Anschluss ein β-Aktin-Antikörper eingesetzt. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western-Blot von mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Veröffentlicht in [136].

Der TLR2-FL-Klon sekretierte konstitutiv TFF3-Peptid in das Zellkulturmedium. Im Vergleich dazu war im Überstand der untransfizierten Caco-2-Zellen deutlich weniger TFF3 nachweisbar. Im TLR2-R753Q-Klon war kein TFF3-Peptid im Western-Blot feststellbar (Abb.3.14.).

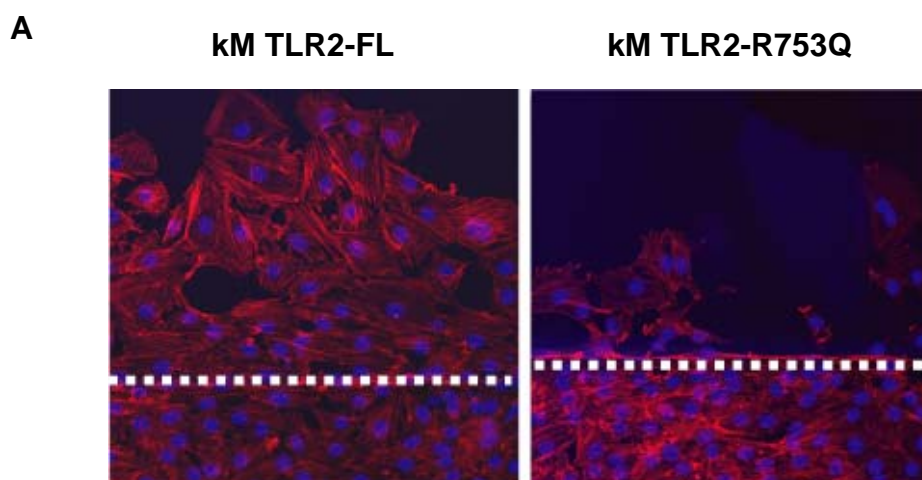
Die Expression von HA im zugehörigen Western-Blot der Zelllysate bestätigte die Expression der Transgene in den verwendeten Klonen. Die Überprüfung mit einem β -Aktin-Antikörper bestätigte den Einsatz gleicher Proteinmengen.

Zusammenfassend exprimierte und sekretierte der TLR2-FL-Klon konstitutiv TFF3-Peptid, während in dem TLR2-R753Q-Klon fast keine TFF3-Produktion nachweisbar war.

3.3.5.2. Einfluss konditionierter Medien auf die Wundheilung von IEC-6-Zellen

Um die Kontinuität der Epitheloberfläche bei einer Wunde wieder herzustellen und die offene Fläche zu bedecken, müssen Epithelzellen, die an die Wunde angrenzen, in die Wunde migrieren. Zur funktionellen Untersuchung der intestinalen Zellmigration wurde ein standardisiertes Wundheilungsmodell mit einer konfluenten Schicht von IEC-6-Zellen verwendet [44].

In diesem Modell wurde hier ein möglicher Effekt von konditioniertem Medium (kM) untransfizierter Caco-2-Zellen, des TLR2-FL-Klons und des TLR2-R753Q-Klons auf die Migration von verwundeten IEC-6-Zellen untersucht. Rekombinantes humanes TFF3 wurde mit 50 μ g/ml als Positivkontrolle eingesetzt. Nach 20 Stunden Inkubation wurde das Zytoskelett der IEC-6-Zellen mit Phalloidin angefärbt. Am konfokalen Laser Scanning Mikroskop wurden die Präparate im Anschluss auf Einwanderung in den Wundbereich ausgewertet.



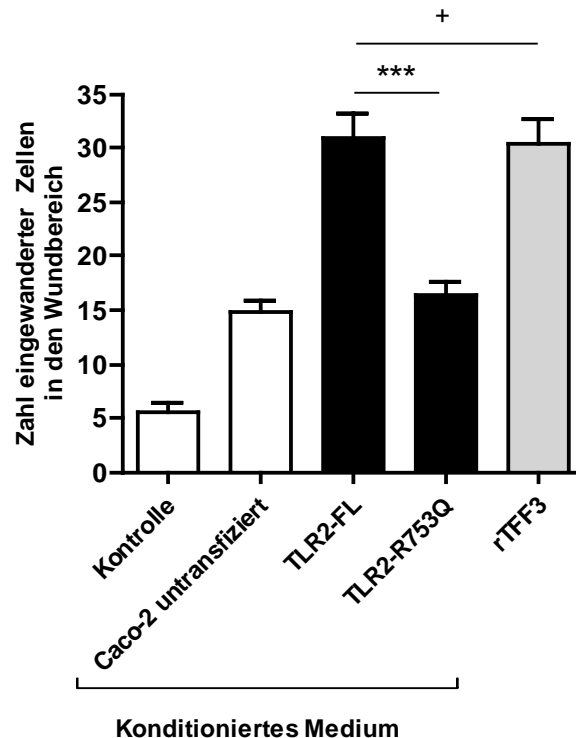
B

Abb.3.15. Einfluss von konditioniertem Medium (kM) von Caco-2-Zellen, den TLR2-Klonen und TFF3 auf die Migration von verwundeten IEC-6 Zellen.

(A) Konfluente IEC-6 Monolayer wurden verwundet und 20h mit serumreduziertem konditioniertem Medium von untransfizierten Caco-2-Zellen, dem TLR2-FL-, TLR2-R753Q-Klon oder rekombinantem humanem TFF3 (50µg/ml) als Positivkontrolle inkubiert. Im Anschluss wurden die IEC-6-Zellen mit Phalloidin (AlexaFluor® 647, rot) für das Zytoskelett und DAPI (blau) für die Zellkerne gefärbt. (20x; Scan Zoom 1,0) Die Abbildungen zeigen repräsentative Ausschnitte der Wundbereiche, wobei die Wundränder als weiße gestrichelte Linien angezeigt sind (n = 3).

(B) Die Migration wurde als Zahl der in den Wundbereich eingewanderten Zellen quantifiziert und statistisch ausgewertet. Diese erfolgte aus drei unabhängigen Experimenten (n=3), wobei pro Präparat mehrere Wundränder zufällig ausgewertet wurden. Die eingewanderten Zellen wurden dabei ohne Kenntnis des Präparats ("blinded") gezählt. *** p < 0,001; + p < 0,05. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Veröffentlicht in [136].

Das konditionierte Medium des TLR2-FL-Klons förderte im Vergleich zu den Überständen untransfizierter Caco-2-Zellen oder des TLR2-R753Q-Klons signifikant die Migration der IEC-6-Zellen in den Wundbereich (Abb.3.15.). Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf das sekretierte TFF3 zurückzuführen. Die Zahl der migrierten Zellen bei Inkubation mit konditioniertem Medium des TLR2-FL-Klons war vergleichbar mit der Anzahl eingewanderter Zellen bei der gleichen Proteinmenge an rekombinantem TFF3 (Abb.3.15.B). Zusätzlich waren sämtliche konditionierte Medien mit 0,1% FCS serumreduziert. Dies machte mögliche andere Faktoren und Bestandteile aus den konditionierten Medien als Ursache für eine vermehrte Migration eher unwahrscheinlich.

Das konditionierte Medium untransfizierter Caco-2-Zellen und des TLR2-R753Q-Klons, die beide kaum TFF3 produzieren und sekretieren (Abb.3.14.), bedingte hingegen nur eine geringfügig höhere Migration der IEC-6-Zellen in den Wundbereich im Vergleich zum Kontrollmedium.

Somit förderte die Überexpression von TLR2 die Wundheilung durch die vermehrte Produktion und Sekretion von TFF3. Im TLR2-R753Q-Klon führte der Verlust von TFF3 zu einer defekten Migration während des Wundheilungsprozesses.

3.4. Morphologische und funktionelle Untersuchungen von TLR4-FL und den CED-assoziierten Polymorphismen TLR4-T399I und TLR4-D299G im intestinalen Epithel

Während der akuten Phase der CED-Colitis ist die TLR4-Protein-Expression in IEC signifikant hochreguliert [21]. Die TLR4-Polymorphismen D299G und T399I wurden mit einer erhöhten Prädisposition für chronisch entzündliche Darmerkrankungen assoziiert [43]. Die phänotypischen Ausprägungen dieser Genvarianten sind noch unbekannt, so dass hier die Auswirkungen der CED-assoziierten TLR4-Mutationen D299G und T399I auf zellbiologische und molekulare Funktionen von IEC untersucht wurden.

3.4.1. Morphologie

Im Kulturverlauf nach der stabilen Transfektion zeigten die Genotypen der TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G in vergleichbarer Passagenzahl unterschiedliche phänotypische Ausprägungen. Alle Zellen wurden zur Beobachtung in Poly-D-Lysin-beschichteten T25-Kulturflaschen mit vergleichbaren Konzentrationen ausgesät. Die Inkubation der Zellen wurde im selben Untersuchungszeitraum unter identischen Bedingungen (37°C, 5% CO₂) durchgeführt. Die Charakterisierung der Zellmorphologie erfolgte nach 7 Tagen Kultivierung bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 70-80%.

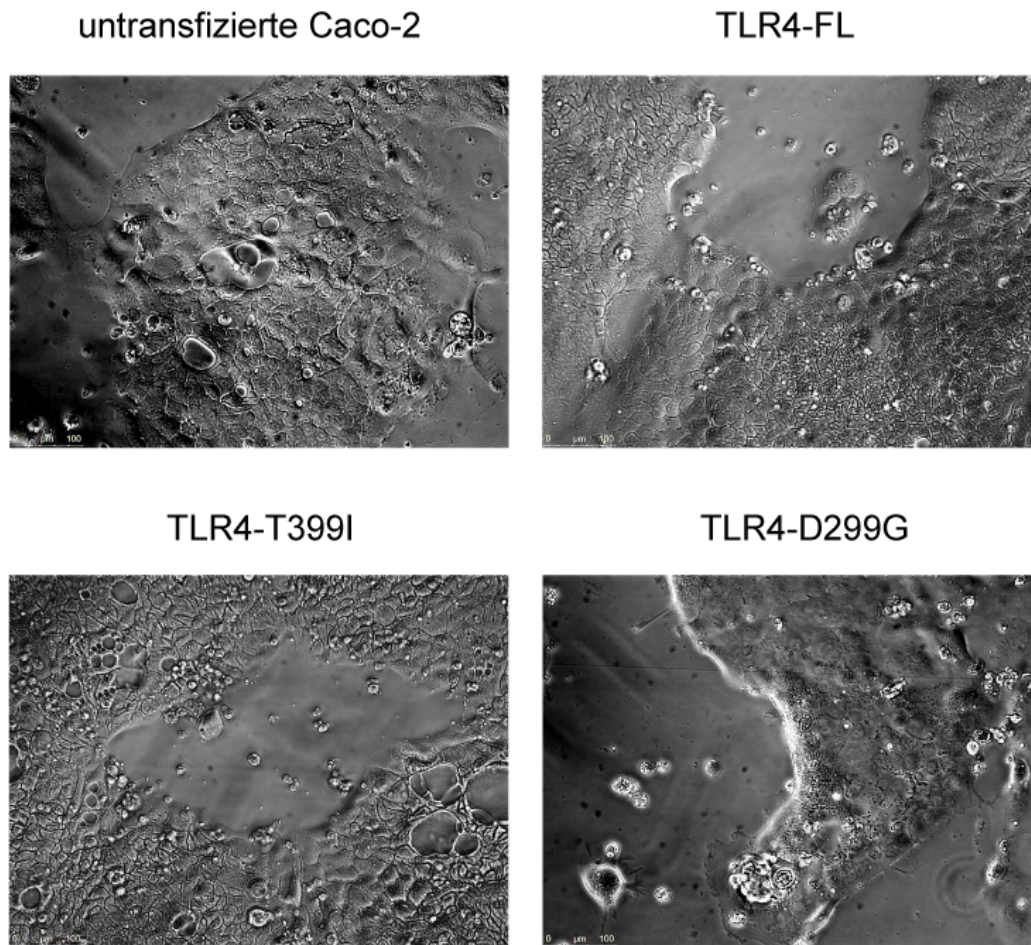


Abb.3.16. Lichtmikroskopische Charakterisierung untransfizierter Caco-2-Zellen und der TLR4-Klone. Untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR4-FL-Klon, der TLR4-T399I-Klon und der TLR4-D299G-Klon wurden bei einer Konfluenz von ca. 70-80% mit einem Leica DMI6000 Mikroskop im Phasenkontrast bei 10facher Vergrößerung dokumentiert. Die gezeigten Bildausschnitte zeigen einen repräsentativen Ausschnitt der T25-Kulturflasche. 100µm sind jeweils mit dem Balken in der linken unteren Bildecke gekennzeichnet.

Untransfizierte Caco-2-Zellen und die beiden TLR4-Klone TLR4-FL und TLR4-T399I wuchsen in regelmäßig angeordneten Monolayern mit kubischen Zellen vergleichbarer Größe (Abb.3.16.). Dabei wies der TLR4-FL-Klon die geringste Zellgröße auf, waren allerdings neben dem TLR4-T399I-Klon homogener als untransfizierte Caco-2-Zellen. Das Zytoplasma war meist klar oder schwach granuliert und die Zellkerne waren rundlich.

Im Gegensatz dazu wuchs der TLR4-D299G-Klon in einem stark heterogenen Monolayer. Hierbei zeigte der TLR4-D299G-Klon viele große multinukleäre Zellen mit heterogenem Zytoplasma, unscharfen Zellrändern und hyperchromatischen, irregulär geformten Zellkernen. Diese Veränderungen waren nicht spezifisch für den hier dargestellten Zellklon, sondern wurden auch in mindestens drei anderen TLR4-

D299G-Klonen mit einer geringfügig niedrigeren Transfektionseffektivität beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Caco-2-Zellen sind in der Lage, ähnlich wie Becherzellen, Schleim (sog. Mucus) zu sezernieren [70]. Alle stabil transfizierten TLR4-Klone produzierten jedoch im Gegensatz zu untransfizierten Caco-2-Zellen kaum visuell nachweisbaren, intrazellulären Mucus. Diese morphologische Veränderung wurde wahrscheinlich durch die stabile Transfektion und die anschließende Kultivierung mit Blastizidin hervorgerufen.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Überexpression der TLR4-Varianten phänotypische Auswirkungen hatte. Den deutlichsten Phänotyp zeigte dabei der TLR4-D299G-Klon, der an maligne Tumorzellen erinnerte. Dies wurde nachfolgend weiter untersucht.

3.4.2. Aktinzytoskelett

Die in Abb.3.16. lichtmikroskopisch gezeigten morphologischen Störungen im TLR4-D299G-Klon wiesen auf eine Desorganisation des Aktinzytoskeletts hin. Um dies zu überprüfen, wurden die Aktinfilamente in einer Fluoreszenzfärbung mit AlexaFluor® 647-gekoppeltem Phalloidin visualisiert und am Laser Scanning Mikroskop ausgewertet.

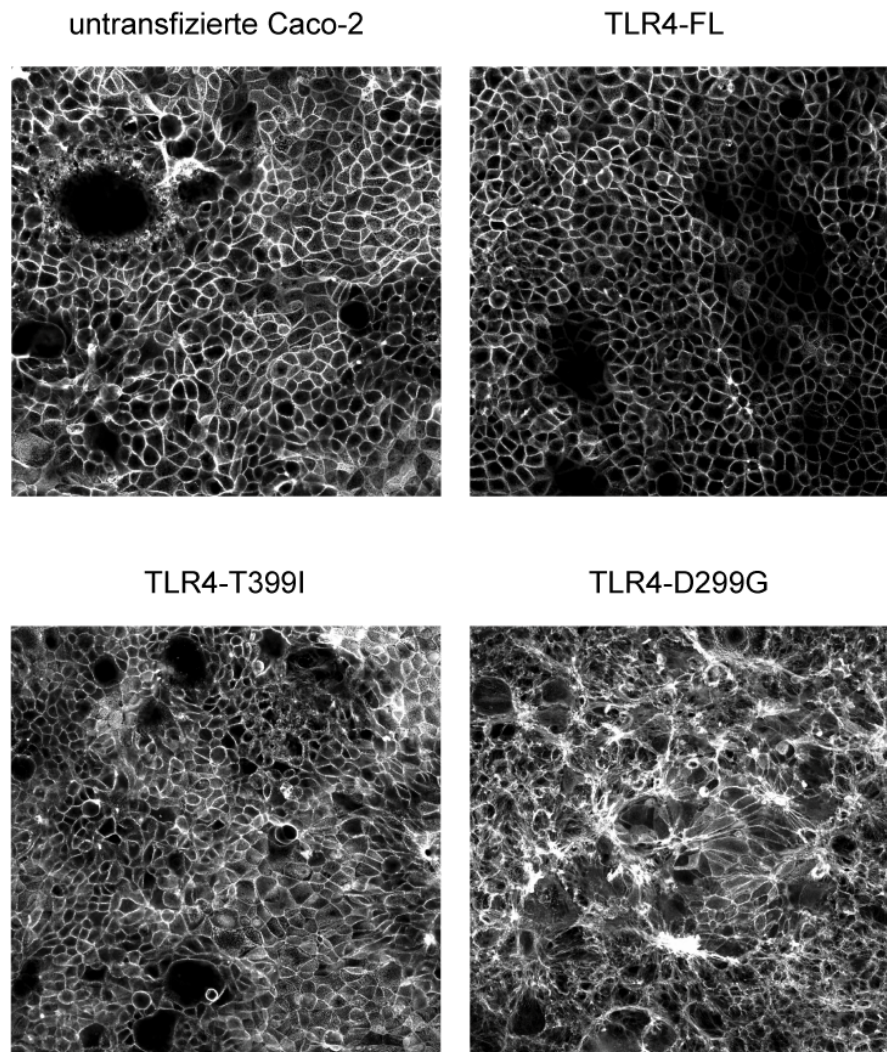


Abb.3.17. Phalloidinfärbung untransfizierter Caco-2-Zellen und der TLR4-Klone. In untransfizierten Caco-2-Zellen, dem TLR4-FL-, TLR4-T399I- und TLR4-D299G-Klon wurden mit fluoreszenzmarkierten Phalloidin (AlexaFluor® 647, weiß) die Aktinfilamente angefärbt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Bildausschnitte der einzelnen Klone, die am konfokalen Laser Scanning Mikroskop dokumentiert wurden (Plan-Apochromat 20x/0,75 Zoom 1,0).

Wie in Abb.3.17. gezeigt ist, veränderte die Überexpression des TLR4-D299G-Plasmids deutlich die Organisation des Aktinzytoskeletts. Die Aktinfilamente erschienen verdichtet, gebündelt und wellten sich unregelmäßig durch mehrere Zellverbände hindurch. Hingegen demonstrierten die anderen TLR4-Klone TLR4-FL und TLR4-T399I ein vergleichbares Bild zu untransfizierten Caco-2-Zellen. Hier waren die Aktinfilamente klar definiert und scharf abgrenzbar. Den höchsten Ordnungsgrad und die geringste Zellgröße wies, wie in den lichtmikroskopischen Aufnahmen, der TLR4-FL-Klon auf. Diese Zellen zeigten zusätzlich eine beginnende Ausdifferenzierung, da sie in mehreren Ebenen wuchsen.

Auch in der Phalloidininfärbung war der alterierte Phänotyp des TLR4-D299G-Klons morphologisch deutlich erkennbar.

3.4.3. Proliferation

Der heterogene Phänotyp des TLR4-D299G-Klons mit seinen unregelmäßig großen, multinukleären Zellen ließ auf ein gestörtes Zellteilungs- und Proliferationsverhalten in diesen Zellen schließen.

Das Proliferationsverhalten der TLR4-Klone wurde mit Hilfe des BrdU-Einbaus in einem ELISA quantitativ analysiert. Hierzu wurden untransfizierte Caco-2-Zellen und die drei TLR4-Klone mit gleichen Zellzahlen (10.000 Zellen pro 100µl) ausplattiert und ihre Proliferationsrate nach 19h, 43h und 67h bestimmt.

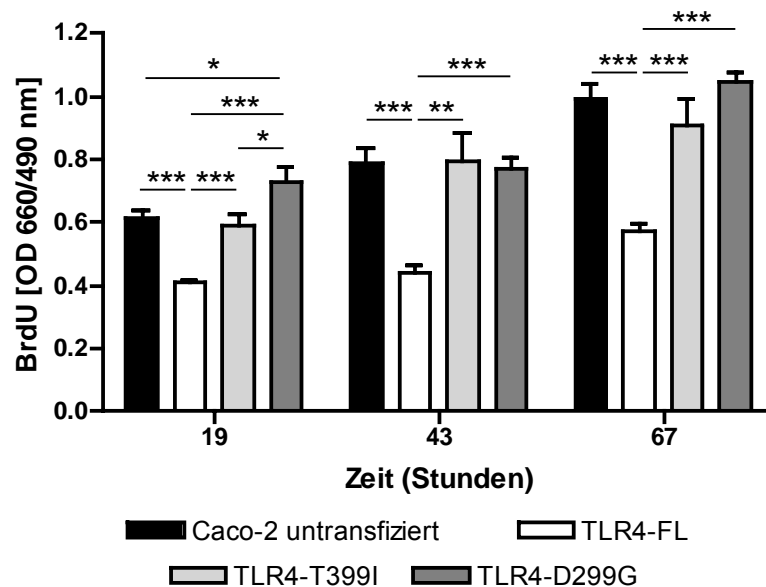


Abb.3.18. Proliferationsverhalten der TLR4-Klone. Untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR4-FL-, TLR4-T399I- und TLR4-D299G-Klon wurden mit gleichen Zellzahlen (10.000 Zellen in 100µl) ausplattiert und die Proliferation durch den Einbau des Basenanalogs BrdU nach 19h, 43h und 67h in einem ELISA bestimmt. Die Abbildung präsentiert die Zusammenfassung zweier unabhängiger Experimente, in denen die Zellen im Sechsfachansatz ausplattiert wurden. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

Entgegen der Erwartungen nach der lichtmikroskopischen Charakterisierung der Zellen (Abb.3.16.) zeigte der TLR4-D299G-Klon eine vergleichbare Proliferationsrate zu untransfizierten Caco-2-Kontrollzellen und den Zellen des TLR4-T399I-Klons. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von TLR4-FL zu einer signifikant verminderten Proliferation (Abb.3.18.). Dies könnte mit der schnellen

Ausdifferenzierung der TLR4-FL-Zellen unter normalen Kulturbedingungen erklärt werden, die schon in der Phalloidininfärbung (Abb.3.17.) sichtbar wurde.

Zusammenfassend schien der Genotyp der TLR4-D299G-Mutation keinen phänotypischen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen des Klon zu haben, während der TLR4-FL-Klon eine signifikant verminderte Proliferationsrate aufwies.

3.4.4. Metabolische Aktivität

Neben ihrem Wachstumsverhalten wurden die TLR4-Klone auf ihre metabolische Aktivität untersucht. Der Phänotyp des TLR4-D299G-Klons mit seinen unregelmäßigen, stark vergrößerten Zellen deutete auf einen veränderten Stoffwechsel in diesen Zellen hin.

Die metabolische Aktivität wurde, wie für die TLR2-Klone, mit Hilfe eines MTS Assays untersucht. Hierbei wurde der Stoffwechsel der Zellen durch den Umsatz eines Tetrazoliumsalzes analysiert. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR4-Klone wurden mit gleichen Zellzahlen (10.000 Zellen pro 100µl) ausplattiert und die metabolische Aktivität nach 19h, 43h und 67h gemessen.

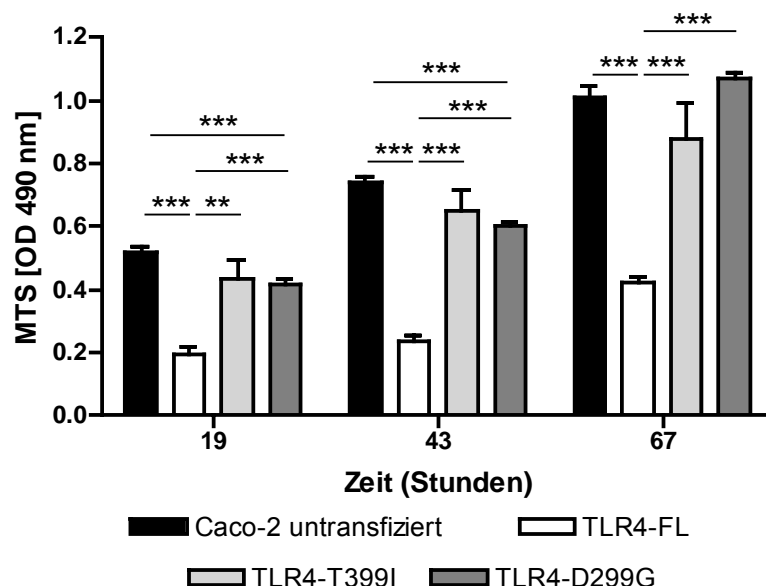


Abb.3.19. Metabolische Aktivität der TLR4-Klone. Untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR4-FL-, TLR4-T399I- und TLR4-D299G-Klon wurden mit gleichen Zellzahlen (10.000 Zellen pro 100µl) ausplattiert und die metabolische Aktivität nach 19h, 43h und 67h im MTS-Assay bestimmt. Die Abbildung präsentiert die Zusammenfassung zweier unabhängiger Experimente, in denen die Zellen

im Sechsfachansatz ausplattiert wurden. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR4-T399I- und der TLR4-D299G-Klon zeigten, wie schon in der Proliferation, eine vergleichbare metabolische Aktivität (Abb.3.19.). Diese stieg im Kulturverlauf an. Im Gegensatz dazu demonstrierte der TLR4-FL-Klon einen signifikant verminderten Stoffwechsel zu allen drei Zeitpunkten. Dies könnte mit der geringeren Größe der Zellen und ihrer schnellen Ausdifferenzierung erklärt werden.

Zusammenfassend präsentierte der TLR4-D299G-Klon in seiner metabolischen Aktivität entgegen der Erwartungen kein abweichendes Verhalten zu untransfizierten Caco-2-Zellen oder dem TLR4-T399I-Klon. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von TLR4-FL zu einem signifikant verminderten Stoffwechsel in Caco-2-Zellen.

3.4.5. Analyse der Mitosen

Der TLR4-D299G-Klon zeigte weder ein abweichendes Proliferationsverhalten noch eine abweichende metabolische Aktivität im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen oder dem TLR4-T399I-Klon. Morphologisch wies der Phänotyp dieser Zellen mit mehreren, hyperchromatischen Zellkernen jedoch auf einen gestörten Zellteilungsablauf hin. Die Mitosen wurden deshalb mit Hilfe von Fluoreszenzfärbungen analysiert.

Hierbei wurde mit einer Phospho-Histon H3 Färbung die dekondensierte DNA der mitotischen Zellen in den TLR4-Klonen angefärbt. Zusätzlich wurden der Spindelapparat und das Zytoskelett mit einem β -Tubulin Antikörper sichtbar gemacht.

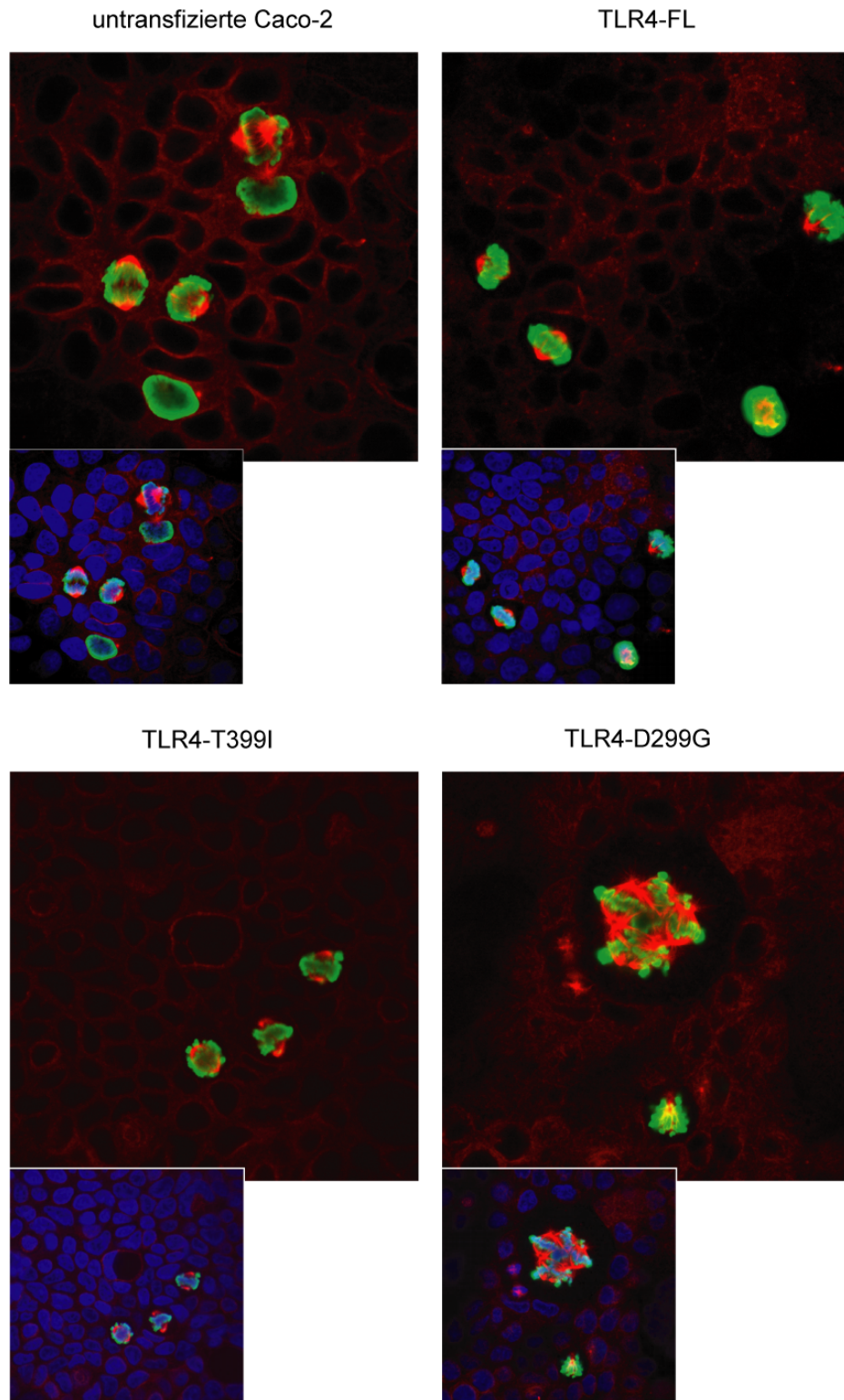


Abb.3.20. Immunfluoreszenzfärbung der Mitosen in den TLR4-Klonen. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden mit direkt fluoreszenzmarkierten Phospho-Histon H3 (AlexaFluor® 488, grün) und β -Tubulin (Alexa Fluor® 555, rot) Antikörpern gefärbt. Die kleineren Bilder zeigen zusätzlich die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Bildausschnitt pro Klon von zwei unabhängigen Versuchen (Plan-Apochromat 63x/1,4, Öl, DIC Zoom 1,0).

Untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR4-FL- und der TLR4-T399I-Klon zeigten in den Immunfluoreszenzfärbungen normale Metaphasen (Abb.3.20.). Die Spindelapparate hatten zwei gegenüberliegende Spindelpole. Zwischen den beiden Spindelpolen lagen die dekondensierten Chromosomen in der Äquatorialebene. Die Frequenz der Mitosen war zwischen den verschiedenen Zellen vergleichbar.

Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen des TLR4-D299G-Klons deutlich abweichende Metaphasen. Obwohl eine erhöhte Mitoserate nicht zu beobachten war, waren im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen, dem TLR4-FL- und dem TLR4-T399I-Klon viele der mitotischen Zellen des TLR4-D299G-Klons deutlich größer und zeigten einen gestörten Aufbau der Spindelapparate. Die individuellen Zellen des TLR4-D299G-Klons enthielten bis zu sechs Spindelpole und schienen mehr DNA als die anderen Klone zu besitzen (Abb.3.20. unten rechts). Das lässt darauf schließen, dass in solch einer aberrierten Zellteilung des TLR4-D299G-Klons mehr als zwei Tochterzellen mit abweichenden Chromosomensätzen entstehen könnten.

Zusammenfassend zeigte der TLR4-D299G-Klon vor allem in den vergrößerten Zellen einen gestörten Ablauf der Zellteilungen mit mehreren Spindelpolen.

3.4.6. Regulation der Barrierefunktion, Entzündungsmediatoren und Tumorentstehung

Um einen ersten Einblick in die Mechanismen zu erhalten, die dem alterierten Phänotyp der TLR4-D299G-Mutante auf Genebene zu Grunde liegen, wurde von der Firma "The Microarray Facility" der Universität Tübingen eine DNA-Microarray-Analyse (Human Gene 1.0 ST; Affymetrix) durchgeführt. Die so erhobenen Daten wurden mit Hilfe der "Ingenuity Pathway Analysis" Software ausgewertet.

Zusammenfassend wurden 288 Gene identifiziert, die in dem TLR4-D299G-Klon im Vergleich zu den anderen Klonen mehr als zweifach signifikant verändert waren. Dabei gehörten die Gene, die am stärksten dysreguliert waren, zur "Akuten Phase Regulation", "Koagulation", "Komplementkaskade" und/oder "Tumorentstehung". Diese Mikroarray-Daten sind nicht Gegenstand dieser Arbeit, sondern dienten als Ausgangspunkt für weitergehende Untersuchungen auf mRNA- und Proteinebene der verschiedenen Zellklone.

Insgesamt wurden 11 Gene durch quantitative Realtime PCRs mit denselben Proben analysiert. Diese mRNA-Proben wurden jeweils im Triplikat angesetzt und spiegelten

den Zellstatus nach acht Tagen Kultur wider. Für die Analyse der Proteinexpression ausgewählter Gene wurden Gesamtproteinlysate eingesetzt, die analog zu den verwendeten mRNA-Proben generiert wurden.

Zusätzlich wurde auch die Sekretion einiger Faktoren in ELISAs untersucht. Hierzu wurde konditioniertes Medium zu gleichen Bedingungen, d.h. nach acht Tagen Kultur, im Triplikat generiert.

Im Folgenden werden die Daten von Genen der Gruppen "Barrierefunktion", "Entzündungsreaktion" und "Tumorentstehung" exemplarisch präsentiert.

3.4.6.1. Barrierefunktion

Um die Barrierefunktion der TLR4-Klone zu charakterisieren, wurden exemplarisch die Zell-Zell-Kommunikation (Cx43) und Differenzierung (SI) auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

Für die Zell-Zell-Kommunikation wurde zunächst die mRNA-Expression des "*gap junction*" Gens Cx43 analysiert.

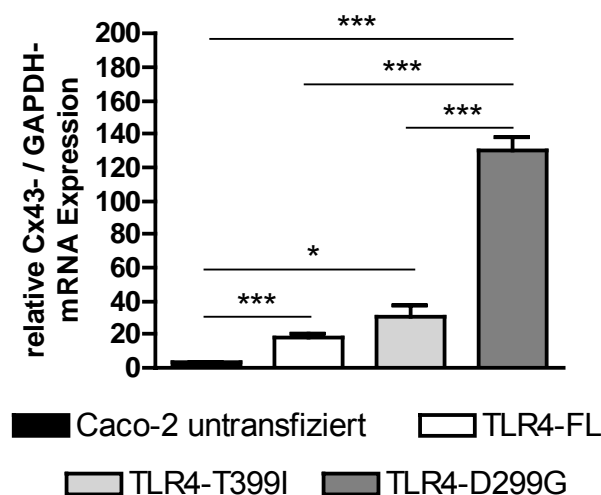


Abb.3.21. mRNA Genexpression von Cx43 in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in quantitativen Realtime PCRs auf mRNA Expression von Cx43 untersucht. Die Kopienzahl von Cx43 wurde für die Auswertung auf das "*housekeeping-Gen*" GAPDH bezogen und als relative Konzentration angegeben. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen PCR-Läufen, in denen die mRNA-Proben im Triplikat eingesetzt wurden. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen TLR4-FL und TLR4-T399I wies der TLR4-D299G-Klon eine signifikant gesteigerte Cx43-

Genexpression auf. TLR4-FL- und TLR4-T399I-Zellen zeigten dabei eine vergleichbare Cx43-mRNA-Expression. Untransfizierte Caco-2-Zellen exprimierten hingegen unter diesen Kulturbedingungen nur minimale Cx43-mRNA Mengen (Abb.3.21.).

Im Western-Blot zeigten die TLR4-Klone und untransfizierte Caco-2-Kontrollzellen dagegen folgendes Bild (Abb.3.22.).

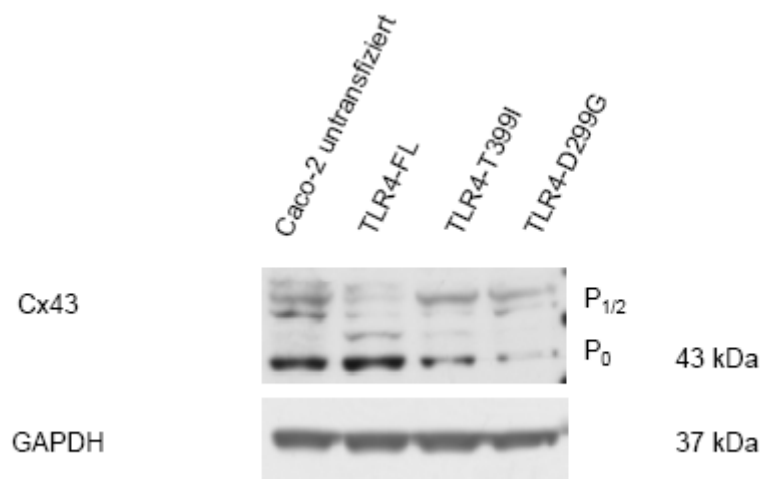


Abb.3.22. Proteinexpression von Cx43. Gesamt-Zelllysate von untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden im Western-Blot auf die Proteinexpression von Cx43 untersucht. Überprüfen des Blots mit anti-GAPDH diente als Ladungskontrolle. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western-Blot von zwei unabhängigen Versuchen.

In der Cx43-Proteinexpression zeigte sich im Vergleich zur Cx43-mRNA-Expression das gegenteilige Bild. In untransfizierten Caco-2- und dem TLR4-FL-Klon, die beide kaum Cx43-mRNA exprimierten, war die höchste Cx43-Proteinexpression detektierbar (Abb.3.22.). Der TLR4-T399I-Klon wies eine deutlich geringere Cx43-Proteinexpression auf. Im TLR4-D299G-Klon, mit der signifikant höchsten mRNA-Expression, war kaum Cx43-Protein nachweisbar.

Cx43 zeigte bereits in den TLR2-Klonen ein spiegelverkehrtes Expressionsmuster zwischen mRNA-Ebene und Proteinebene. So war im TLR2-R753Q-Klon die mRNA-Expression deutlich erhöht (Abb.3.8.). Das Cx43-Protein wurde dann aber posttranslational über das Proteasom verstärkt abgebaut, so dass kaum eine Cx43-Proteinexpression nachweisbar war. Dies könnte ebenfalls im TLR4-D299G-Klon der Fall sein.

Zusammengefasst zeigte der TLR4-D299G-Klon, wie schon der TLR2-R753Q-Klon, zwar eine erhöhte Cx43-mRNA-Expression, aber kaum detektierbare Mengen an Cx43-Protein. Dies wurde wahrscheinlich über das Proteasom verstärkt abgebaut, so dass die Zellen versuchten, den Cx43-Proteinmangel mit einer erhöhten mRNA-Bildung zu kompensieren.

Neben der Zell-Zell-Kommunikation wurde auch die Differenzierung der TLR4-Klone anhand der SI-Genexpression analysiert.

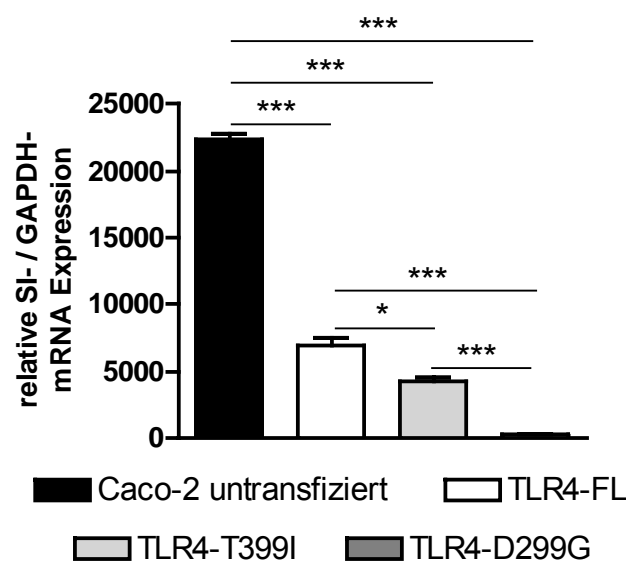


Abb.3.23. mRNA Genexpression von SI in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in quantitativen Realtime PCRs auf die mRNA Expression von SI untersucht. Die Kopienzahl von SI wurde für die Auswertung auf das "housekeeping-Gen" GAPDH bezogen und als relative Konzentration angegeben. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen PCR-Läufen, in denen die mRNA-Proben im Triplikate eingesetzt wurden. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen präsentierten alle drei TLR4-Klone eine signifikant verminderte SI-Genexpression. Unter den TLR4-Klonen exprimierte der TLR4-FL-Klon die höchste Menge an SI-mRNA, gefolgt vom TLR4-T399I- und TLR4-D299G-Klon. Im Gegensatz zu allen anderen Zellen war im TLR4-D299G-Klon fast keine SI-mRNA-Expression nachweisbar (Abb.3.23.).

Dementsprechend besaß der TLR4-D299G-Klon nach acht Tagen Kultur kaum Differenzierungspotential. Wie entartete Tumorzellen erschienen die Zellen des

TLR4-D299G-Klons vielmehr entdifferenziert und erfüllen damit ein weiteres Kriterium für einen potentiellen malignen Tumorphänotyp.

Zusammenfassend zeigte die TLR4-D299G-Mutante eine abweichende Gen- und Proteinexpression für Cx43 (Abb.3.21. und Abb.3.22.), sowie ein stark vermindertes Potential zur Ausdifferenzierung (Abb.3.23.).

3.4.6.2. Entzündungsmediatoren

Des Weiteren wurde die Expression von Genen, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, in den TLR4-Klonen analysiert. Neben der Aktivierung von Entzündungsmediatoren sind auch Mechanismen wie "ER-Stress", Koagulation und die Komplementkaskade an Entzündungsreaktionen beteiligt. Diese Gene wurden zunächst auf mRNA-Ebene in quantitativen Realtime PCRs untersucht. Der funktionelle Nachweis erfolgte über die Quantifizierung ausgewählter sekretierter Proteine in ELISAs.

In den Array Daten zeigten die beiden Gene "*Interleukin 2 Rezeptor Gamma*" (IL2RG) und "*Annexin A1*" (ANXA1) deutliche Unterschiede in der Genexpression in den TLR4-Klonen. Dies wurde hier in quantitativen Realtime PCRs überprüft.

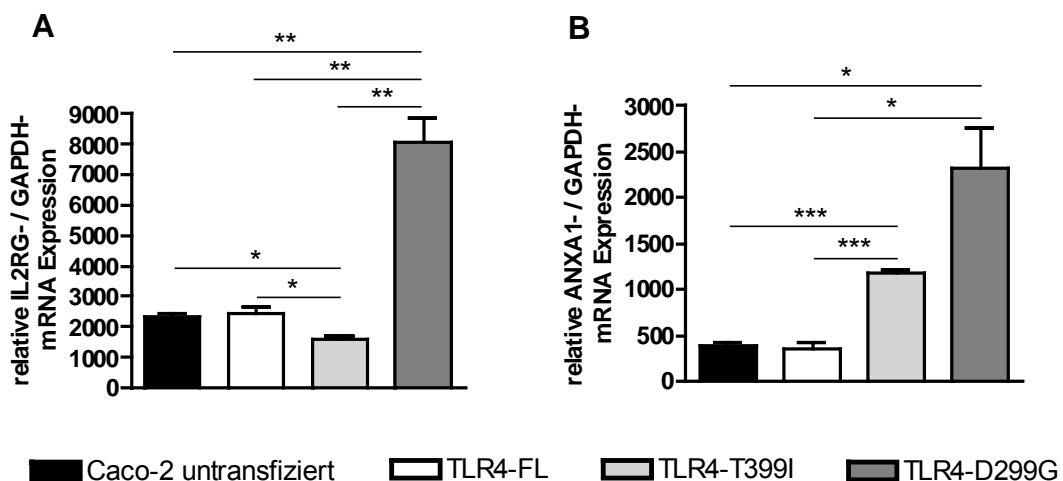


Abb.3.24. mRNA Genexpression von IL2RG (A) und ANXA1 (B) in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in quantitativen Realtime PCRs auf mRNA Expression von IL2RG (A) und ANXA1 (B) untersucht. Die Kopienzahlen von IL2RG und ANXA1 wurden für die Auswertung auf das "housekeeping-Gen" GAPDH bezogen und als relative Konzentrationen angegeben. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen PCR-Läufen, in denen die mRNA-Proben im Triplikat eingesetzt wurden. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Sowohl für IL2RG als auch für ANXA1 zeigte der TLR4-D299G-Klon die signifikant höchste mRNA-Expression im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen, dem TLR4-FL- und dem TLR4-T399I-Klon. Untransfizierte Caco-2-Zellen und der TLR4-FL-Klon wiesen ähnliche IL2RG-mRNA-Mengen auf, die im Vergleich zum TLR4-T399I-Klon beide signifikant gesteigert waren (Abb.3.24.A).

In der ANXA1-mRNA-Genexpression war ebenfalls kein Unterschied zwischen untransfizierten Caco-2-Zellen und dem TLR4-FL-Klon feststellbar. Im Vergleich zu diesen exprimierte der TLR4-T399I-Klon allerdings signifikant mehr ANXA1-mRNA (Abb.3.24.B).

Für den Bereich der Entzündungsmediatoren zeigte der TLR4-D299G-Klon eine deutlich gesteigerte Expression der exemplarisch untersuchten Gene IL2RG und ANXA1.

"ER-Stress" kann auch an der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt sein [86]. BIP/GRP78 ist ein Hauptprotein des Endoplasmatischen Retikulums, dessen Expression hier im Western-Blot untersucht wurde.

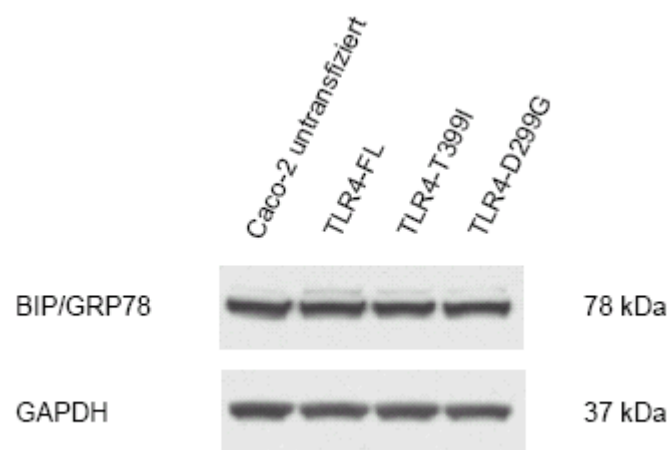


Abb.3.25. Proteinexpression von BIP/GRP78 in den TLR4-Klonen. Gesamt-Zelllysate von untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden im Western-Blot auf die Proteinexpression von BIP/GRP78 untersucht. Überprüfen des Blots mit anti-GAPDH diente als Ladungskontrolle. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western-Blot von zwei unabhängigen Versuchen.

Untransfizierte Caco-2-Zellen und die drei TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G zeigten eine vergleichbare BIP/GRP78-Proteinexpression im Western-Blot bei gleicher Beladung des Gels (Abb.3.25.).

Somit wiesen die TLR4-Klone keinen "ER-Stress" auf und das Endoplasmatische Retikulum war nicht fehlreguliert.

Bei einer Entzündungsreaktion kann auch die Koagulationskaskade aktiviert werden. Es wurde die Genexpression zweier Hauptmoleküle der Koagulation "*Alpha-2-Makroglobulin*" (A2M) und "*Tissue Factor Pathway Inhibitor*" (TFPI) exemplarisch untersucht.

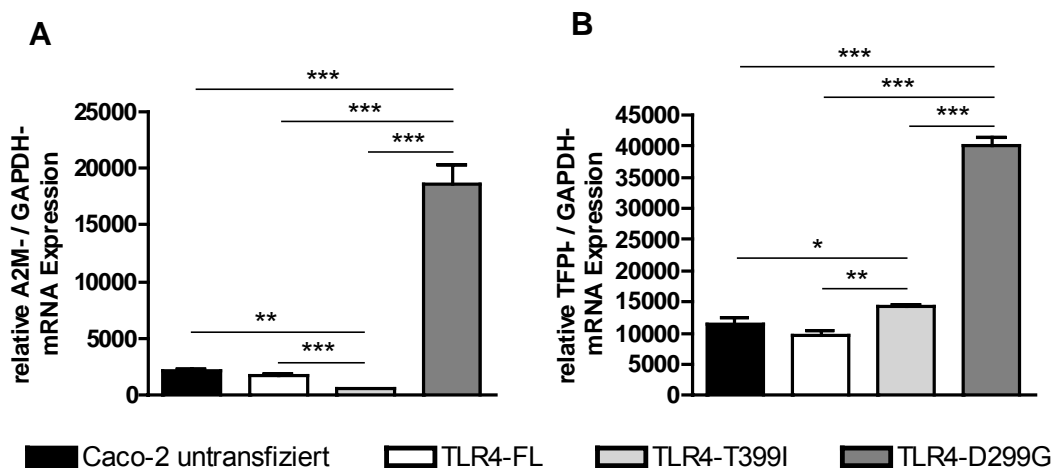


Abb.3.26. mRNA Genexpression von A2M (A) und TFPI (B) in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in quantitativen Realtime PCRs auf mRNA Expression von A2M (A) und TFPI (B) untersucht. Die Kopienzahlen von A2M und TFPI wurden für die Auswertung auf das "housekeeping-Gen" GAPDH bezogen und als relative Konzentrationen angegeben. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen PCR-Läufen, in denen die mRNA-Proben im Triplikat eingesetzt wurden. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Der TLR4-D299G-Klon zeigte im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen, dem TLR4-FL- und TLR4-T399I-Klon die signifikant höchste mRNA-Expression, sowohl für A2M als auch für TFPI. Untransfizierte Caco-2-Zellen und der TLR4-FL-Klon wiesen für beide Gene eine vergleichbare Genexpression auf. Der TLR4-T399I-Klon zeigte die signifikant niedrigste A2M Genexpression, exprimierte allerdings signifikant mehr TFPI als untransfizierte Caco-2-Zellen und TLR4-FL-Zellen (Abb.3.26.).

Auch für zwei Hauptgene der Koagulation zeigte der TLR4-D299G-Klon eine signifikant erhöhte Genexpression der Gene A2M und TFPI.

Diese erhöhte mRNA-Expression wurde funktionell in ELISAs weiter untersucht. Hierzu wurde konditioniertes Medium untransfizierter Caco-2-Zellen und der TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G im Duplikat in die ELISAs eingesetzt.

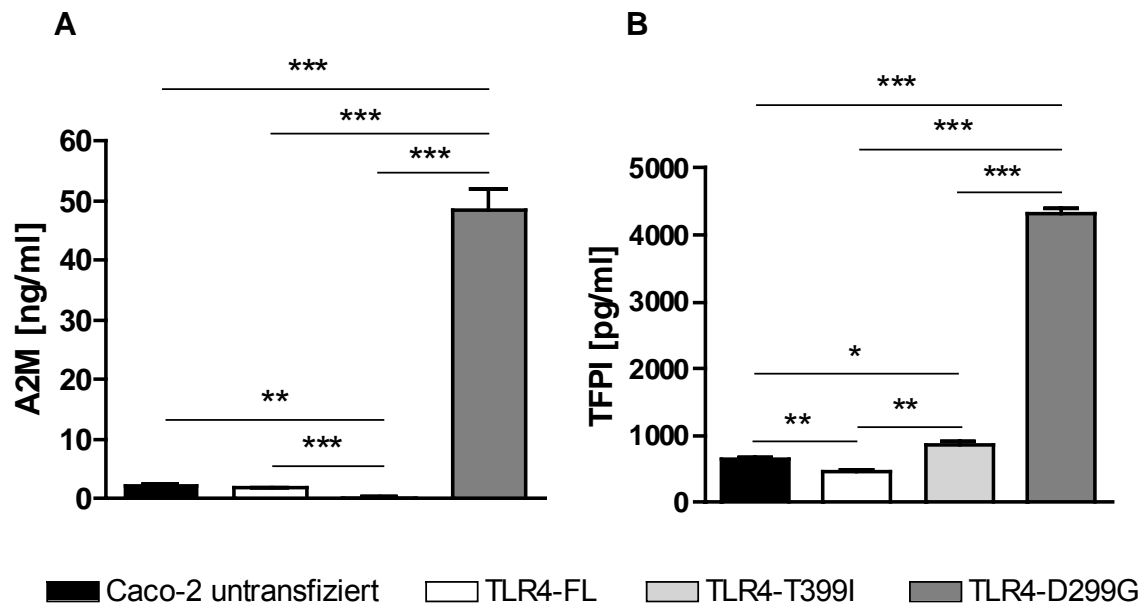


Abb.3.27. Sekretion der Koagulationsfaktoren A2M (A) und TFPI (B). Konditioniertes Medium von untransfizierten Caco-2-Zellen und den drei TLR4-Klonen TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurde in zwei ELISAs auf die Sekretion von A2M (A) und TFPI (B) untersucht. Die Abbildungen zeigen die Zusammenfassung von zwei unabhängigen Messungen. Pro Zellklon wurden die Proben im Triplikат angesetzt und jede Probe im Duplikat im ELISA gemessen. Die Konzentrationen wurden anhand einer Standardkurve berechnet, die ebenfalls im Duplikat angesetzt wurde. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Die Überexpression von TLR4-D299G führte in dem Klon zu einer konstitutiv signifikant erhöhten Sekretion der Koagulationsfaktoren A2M (20-145fach) und TFPI (4-9fach). Im Gegensatz dazu sekretierten sowohl untransfizierte Caco-2-Zellen als auch die TLR4-Klone TLR4-FL und TLR4-T399I kaum A2M und TFPI (Abb.3.27.).

Dementsprechend bestätigten die ELISAs die zuvor erhobenen Daten der quantitativen Realtime PCRs.

Auch die Komplementkaskade ist in Entzündungsreaktionen aktiviert. Exemplarisch für die Komplementkaskade wurde zunächst die Genexpression von C3 und C5 auf mRNA-Ebene analysiert.

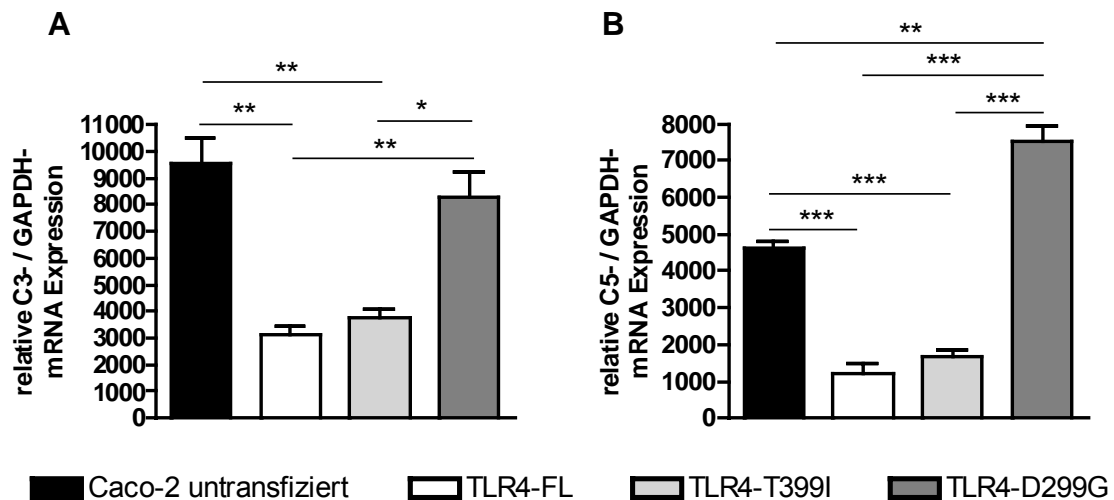


Abb.3.28. mRNA Genexpression von C3 (A) und C5 (B) in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in quantitativen Realtime PCRs auf mRNA Expression von C3 (A) und C5 (B) untersucht. Die Kopienzahlen von C3 und C5 wurden für die Auswertung auf das "housekeeping-Gen" GAPDH bezogen und als relative Konzentrationen angegeben. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von drei (C5), bzw. vier (C3) unabhängigen PCR-Läufen, in denen die mRNA-Proben im Triplikate eingesetzt wurden. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

In der C3-Genexpression zeigten untransfizierte Caco-2-Zellen und der TLR4-D299G-Klon eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression im Vergleich zum TLR4-FL- und TLR4-T399I-Klon (Abb.3.28.A). Verglichen miteinander waren allerdings keine signifikanten Unterschiede in untransfizierten Caco-2-Zellen und dem TLR4-D299G-Klon in der C3-Genexpression feststellbar. Die TLR4-FL- und TLR4-T399I-Klone demonstrierten eine vergleichbare, niedrigere C3-mRNA-Expression.

Im Gegensatz dazu exprimierte der TLR4-D299G-Klon die signifikant höchste C5-mRNA-Menge. Gefolgt wurde dieser von untransfizierten Caco-2-Zellen, die wiederum signifikant mehr C5-mRNA exprimierten als die TLR4-FL- und TLR4-T399I-Klone. Die TLR4-FL- und TLR4-T399I-Klone wiesen eine vergleichbare C5-Genexpression auf (Abb.3.28.B).

Für die beiden Komplementfaktoren C3 und C5 wies der TLR4-D299G-Klon im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen und den anderen TLR4-Klonen eine erhöhte mRNA-Expression auf.

Funktionell wurde die Sekretion dieser beiden Hauptkomplementfaktoren in ELISAs weiter untersucht. Hierzu wurde konditioniertes Medium untransfizierter Caco-2-Zellen und der TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G im Duplikat in die ELISAs eingesetzt. Für die C3a und C5a Sekretion zeigte sich folgendes Bild:

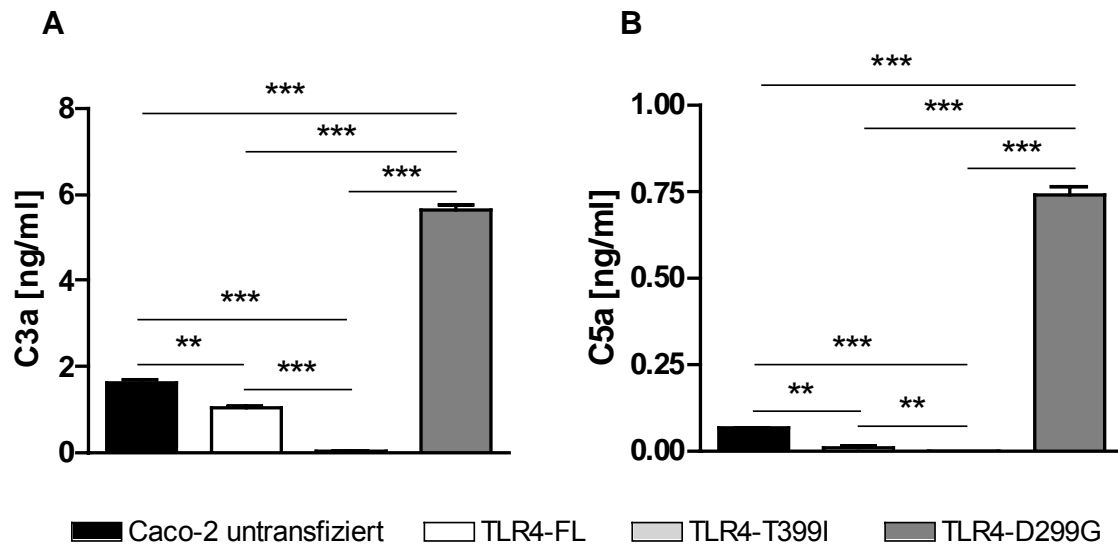


Abb.3.29. Sekretion der Komplementfaktoren C3a (A) und C5a (B). Konditioniertes Medium von untransfizierten Caco-2-Zellen und den drei TLR4-Klonen TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurde in zwei ELISAs auf die Sekretion von C3a (A) und C5a (B) untersucht. Die Abbildungen zeigen die Zusammenfassung von zwei unabhängigen Messungen. Pro Zellklon wurden die Proben im Triplikate angesetzt und jede Probe im Duplikat im ELISA gemessen. Die Konzentrationen wurden anhand einer Standardkurve berechnet, die ebenfalls im Duplikat angesetzt wurde. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Für die Sekretion der Komplementfaktoren C3a und C5a zeigte sich ein vergleichbares Ergebnis zu den Realtime-PCR Daten. Der TLR4-D299G-Klon sekretierte konstitutiv die signifikant höchste Menge an C3a (Abb.3.29.A) und C5a (Abb.3.29.B) im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen, dem TLR4-FL- und dem TLR4-T399I-Klon. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die beiden TLR4-Klone TLR4-FL und TLR4-T399I hingegen sezernierten kaum C3a und C5a.

Dementsprechend bestätigten die ELISAs die zuvor erhobenen Daten der quantitativen Realtime PCRs.

Zusammenfassend zeigte der TLR4-D299G-Klon eine erhöhte Produktion von Entzündungsmediatoren (Abb.3.24.), Gerinnungs- (Abb.3.26. und Abb.3.27.) und Komplementfaktoren (Abb.3.28. und Abb.3.29.). Der TLR4-D299G-Klon wies somit basal eine erhöhte Produktion und Sekretion von Genen und Proteinen einer Entzündungsreaktion auf. Eine Fehlregulation des ER konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Abb.3.25.).

3.4.6.3. Tumorentstehung

In der DNA-Microarray-Analyse zeigte der TLR4-D299G-Klon deutliche Veränderungen in Genen der Tumorentstehung, die durch seine Morphologie und Störungen in der Mitose zuvor schon vermutet wurden. Die Expression der Onkogene "*Cyclooxygenase-2*" (COX-2), cMyc und "*Signal Transducer and Activator of Transcription*" (STAT3) wurde in quantitativen Realtime PCRs auf mRNA-Ebene und in Western-Blots auf Proteinebene untersucht.

Für COX-2 zeigte sich folgende mRNA-Expression:

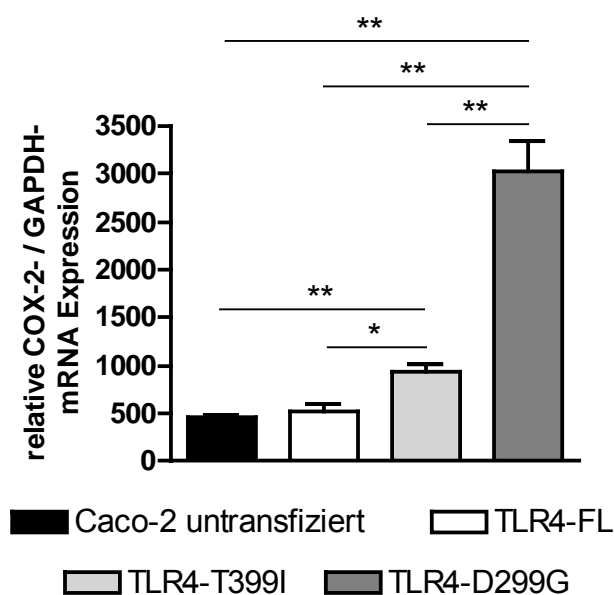


Abb.3.30. mRNA Genexpression von COX-2 in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in quantitativen Realtime PCRs auf mRNA Expression von COX-2 untersucht. Die Kopienzahl von COX-2 wurde für die Auswertung auf das "*housekeeping-Gen*" GAPDH bezogen und als relative Konzentration angegeben. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von drei unabhängigen PCR-Läufen, in denen die mRNA-Proben im Triplikate eingesetzt wurden. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

In der COX-2-Genexpression zeigte der TLR4-D299G-Klon die signifikant höchste COX-2-mRNA-Expression im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen und den beiden TLR4-Klonen TLR4-FL und TLR4-T399I (Abb.3.30.). Der TLR4-T399I-Klon wies die zweithöchste COX-2-Genexpression auf, die signifikant höher war als in untransfizierten Caco-2-Zellen und dem TLR4-FL-Klon. Untransfizierte Caco-2-Zellen und der TLR4-FL-Klon exprimierten dabei vergleichbare Mengen an COX-2-mRNA.

Auf Proteinebene hingegen zeigten die Zellen folgende Expression:

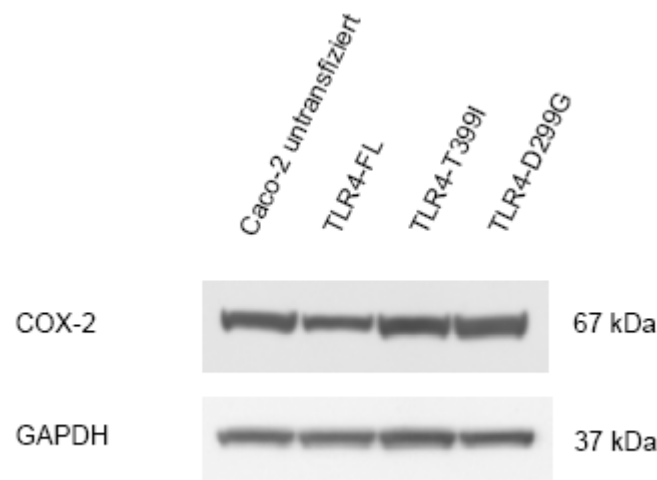


Abb.3.31. Proteinexpression von COX-2. Gesamt-Zelllysate von untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in einem Western-Blot auf die Proteinexpression von COX-2 untersucht. Reproben des Blots mit anti-GAPDH diente als Ladungskontrolle. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western-Blot von zwei unabhängigen Versuchen.

Auf Proteinebene wurde das Realtime-PCR-Ergebnis nicht bestätigt. Untransfizierte Caco-2-Zellen zeigten hier eine vergleichbare COX-2-Proteinexpression zu den beiden TLR4-Klonen TLR4-T399I und TLR4-D299G. Allein der TLR4-FL-Klon demonstrierte eine geringfügig verminderte COX-2-Proteinexpression (Abb.3.31.). Die GAPDH-Banden bestätigten die Beladung des Gels mit gleichen Proteinmengen. Dies spricht gegen eine wesentliche Beteiligung des COX-2-Signalweges an den phänotypischen Ausprägungen der TLR4-D299G-Mutation in diesem Zellklon, da auf Proteinebene keine Unterschiede zu untransfizierten Caco-2-Zellen und dem TLR4-T399I-Klon sichtbar waren.

Als ein weiterer, möglicherweise beteiligter Signalweg an der Tumorentwicklung des TLR4-D299G-Klons wurde die mRNA- und Proteinexpression des Onkogens cMyc untersucht.

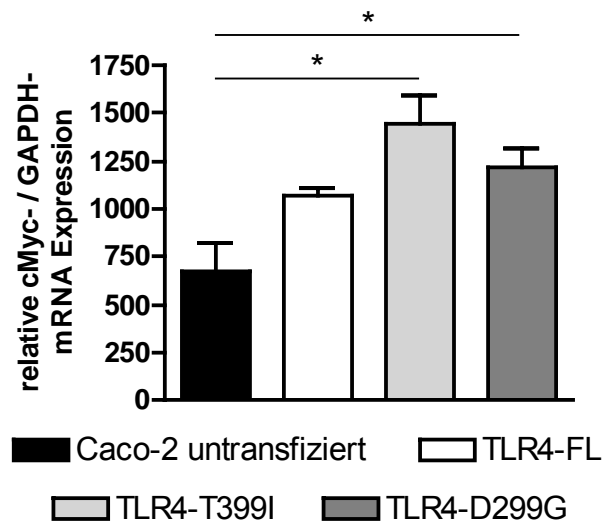


Abb.3.32. mRNA Genexpression von cMyc in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in quantitativen Realtime PCRs auf mRNA Expression von cMyc untersucht. Die Kopienzahl von cMyc wurde für die Auswertung auf das "housekeeping-Gen" GAPDH bezogen und als relative Konzentration angegeben. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen PCR-Läufen, in denen die mRNA-Proben im Triplikат eingesetzt wurden. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen demonstrierten die beiden TLR4-Klone TLR4-T399I und TLR4-D299G eine signifikant gesteigerte cMyc-Genexpression. Untransfizierte Caco-2-Zellen und der TLR4-FL-Klon zeigten eine vergleichbare cMyc-mRNA-Expression, ebenso wie die drei TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G untereinander (Abb.3.32.).

Im Western-Blot zeigte sich folgendes Bild:

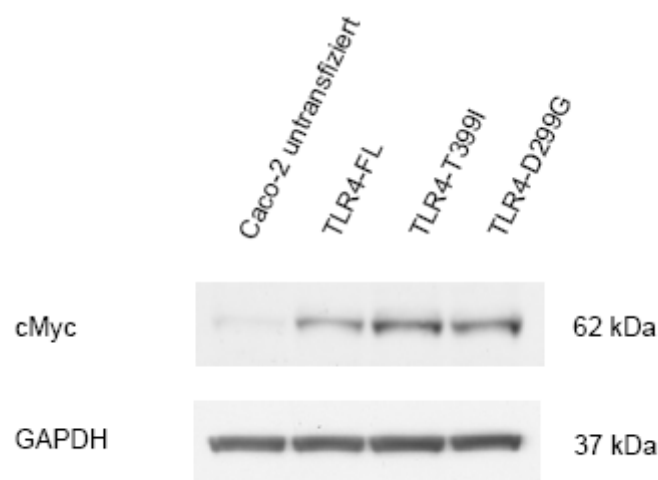


Abb.3.33. Proteinexpression von cMyc. Gesamt-Zelllysate von untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in einem Western-Blot auf die Proteinexpression von cMyc untersucht. Überprüfen des Blots mit anti-GAPDH diente als Ladungskontrolle. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western-Blot von zwei unabhängigen Versuchen.

Die auf mRNA-Ebene signifikant gesteigerte cMyc-Genexpression der TLR4-Klone TLR4-T399I und TLR4-D299G wurde im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen auf Proteinebene im Western-Blot bestätigt (Abb.3.33.). Im Gegensatz zur mRNA-Expression war die cMyc-Proteinexpression in untransfizierten Caco-2-Zellen kaum nachweisbar. In allen stabil transfizierten TLR4-Klonen hingegen war das cMyc-Protein deutlich nachweisbar. Die TLR4-Klone TLR4-T399I und TLR4-D299G demonstrierten eine untereinander vergleichbare cMyc-Protein-Expression. Gleiche Expressionsstärken der GAPDH-Banden bestätigten eine gleiche Beladung des Western-Blots.

Dieses Ergebnis macht eine Beteiligung des cMyc-Signalweges am spezifischen Tumorphänotyp des TLR4-D299G-Klons ebenfalls eher unwahrscheinlich.

Als dritter Signalweg wurde die Expression des Transkriptionsfaktors STAT3 untersucht. STAT3 ist ein Proto-Onkogen und kann die Tumorentstehung im intestinalen Epithel fördern [18] [68].

Auf mRNA-Ebene war folgende STAT3-Genexpression nachweisbar:

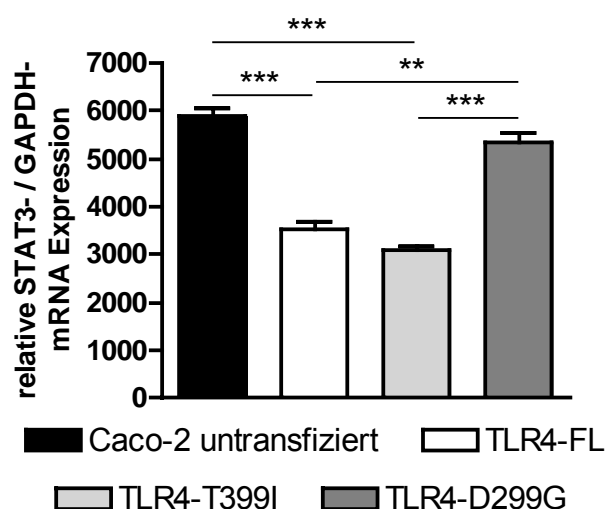


Abb.3.34. mRNA Genexpression von STAT3 in untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in quantitativen Realtime PCRs auf mRNA Expression von STAT3 untersucht. Die Kopienzahl

von STAT3 wurde für die Auswertung auf das "housekeeping-Gen" GAPDH bezogen und als relative Konzentration angegeben. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von drei unabhängigen PCR-Läufen, in denen die mRNA-Proben im Triplikат eingesetzt wurden. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Der TLR4-D299G-Klon zeigte im Vergleich zum TLR4-FL- und TLR4-T399I-Klon eine signifikant gesteigerte STAT3-mRNA-Expression (Abb.3.34.). Diese war vergleichbar zur STAT3-Expression untransfizierter Caco-2-Zellen. Die beiden TLR4-Klone TLR4-FL und TLR4-T399I präsentierten keine signifikanten Unterschiede in der STAT3-mRNA-Expression.

Um eine mögliche Beteiligung des STAT3-Signalweges am malignen Phänotyp des TLR4-D299G-Klons abzuklären, wurde neben der Proteinexpression auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 durch Phosphorylierung am Tyrosin 705 des Proteins im Western-Blot untersucht.

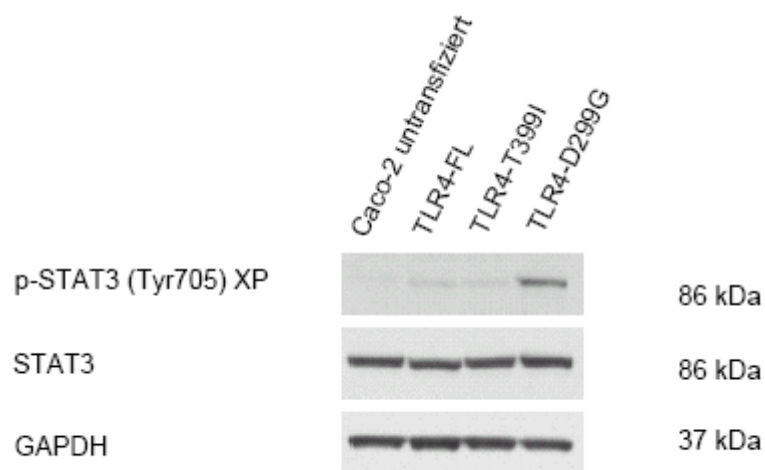


Abb.3.35. Proteinexpression und Aktivierung von STAT3. Gesamt-Zelllysate untransfizierter Caco-2-Zellen und der drei TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in einem Western-Blot auf eine Phosphorylierung des STAT3-Proteins am Tyrosin 705 untersucht. Der Blot wurde anschließend durch Reproben auf die Proteinexpression von totalem STAT3-Protein untersucht. Ein weiteres Reproben mit anti-GAPDH dient als Ladungskontrolle. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western-Blot von drei unabhängigen Versuchen.

In der Expression von totalem STAT3-Protein zeigten sich zwischen untransfizierten Caco-2-Zellen und den drei TLR4-Klonen TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G keine Unterschiede im Western-Blot (Abb.3.35.). Wurde allerdings der Aktivierungszustand von STAT3 über die Phosphorylierung von Tyrosin 705 des STAT3-Proteins untersucht, so demonstrierte der TLR4-D299G-Klon eine deutlich

erhöhte Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3 im Vergleich zu den anderen Zellen. Untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR4-FL- und der TLR4-T399I-Klon wiesen einen vergleichbar niedrigen basalen Phosphorylierungsgrad des STAT3-Proteins auf. Dies ist wahrscheinlich mit dem hohen FCS-Gehalt (20%) im Kulturmedium zu erklären. Die GAPDH-Banden belegten den Einsatz gleicher Proteinmengen im Western-Blot.

Zusammenfassend ist eine Beteiligung des STAT3 Signalweges am Tumorphänotyp des TLR4-D299G-Klons aufgrund der höheren Phosphorylierung und damit Aktivierung wahrscheinlich.

3.4.7. Invasivität

Die Fähigkeit zum invasiven Wachstum ist ein wesentliches Charakteristikum von malignen Tumorzellen. Dabei können mehrere Mechanismen involviert sein, unter anderem der Signalweg des Transkriptionsfaktors STAT3 [95], der in dem TLR4-D299G-Klon signifikant höher phosphoryliert war.

3.4.7.1. Matrigel® Invasionsversuch

Mit Hilfe von Matrigel® beschichteten Zellkultureinsätzen wurde das Invasionsverhalten *in vitro* untersucht. Da der TLR4-D299G-Klon einen tumorzell-ähnlichen Phänotyp mit gestörten Zellteilungen und Fehlregulationen in Genen der Tumorentstehung aufwies, wurden die TLR4-Klone und untransfizierte Caco-2-Zellen in Matrigel® Invasionsversuchen eingesetzt.

Hierzu wurden die Zellen mit gleichen Zellzahlen (130.00 Zellen pro Einsatz) auf beschichteten Matrigel®-Kultureinsätzen ausplattiert und acht Tage kultiviert. Die Kultureinsätze wurden dann invertiert und mit der Kristallviolett-Färbung auf Matrigel-infiltrierende Zellen ausgewertet.

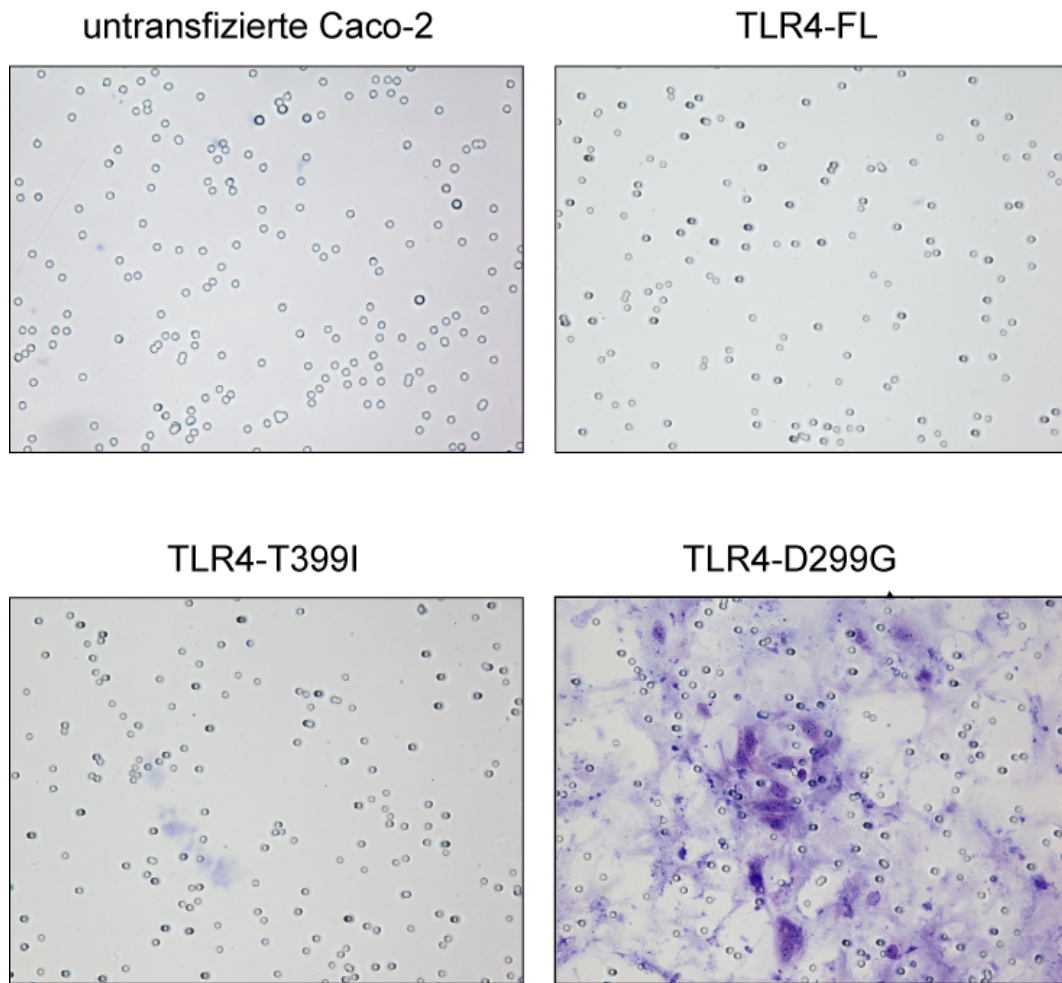


Abb.3.36. Kristallviolett-Färbung invertierter Matrigel®-Kultureinsätze auf invasives Wachstum. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die drei TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden mit gleichen Zellzahlen (130.000 Zellen) auf Matrigel®-beschichtete 6-well-Kultureinsätze ausplattiert. Nach 8 Tagen Kultur wurden die Einsätze invertiert und die Unterseiten mit Kristallviolett auf invasiv gewachsene Zellen angefärbt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ausschnitte der Unterseiten der Zellkultureinsätze von mindestens drei unabhängigen Versuchen (Nikon Eclipse E6000, 4x Vergrößerung).

Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR4-Klone TLR4-FL und TLR4-T399I zeigten nach Kristallviolett-Färbung keine eingewanderten Zellen auf der Unterseite des Zellkultureinsatzes. Die Überexpression der TLR4-D299G-Mutante hingegen führte zur Infiltration der Zellen in diesem *In-vitro*-Invasionsmodell (Abb.3.36.).

Dieser funktionelle Nachweis des invasiven Wachstums *in vitro* bietet einen weiteren Hinweis auf den malignen Tumorzell-Phänotyp des TLR4-D299G-Klons.

3.4.7.2. Mechanismus des invasiven Wachstums des TLR4-D299G-Klons

Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist ein Hauptregulator für Proliferation und maligne Transformation von Zellen. In Kolonkarzinomzellen ist gezeigt worden, dass STAT3 durch Phosphorylierung konstitutiv aktiviert ist [95]. Der TLR4-D299G-Klon zeigte in vorherigen Versuchen eine gesteigerte Aktivierung von STAT3 durch Phosphorylierung an Tyrosin 705.

Die funktionellen Auswirkungen der gesteigerten STAT3-Aktivierung auf die Invasivität des TLR4-D299G-Klons wurden in einem weiteren Matrigel®-Versuch analysiert. Dabei wurde im TLR4-D299G-Klon der STAT3-Signalweg durch die Gabe eines spezifischen STAT3 Inhibitors (STAT3 Inhibitor VI) ab Tag eins der Kultivierung blockiert. Nach 8 Tagen Kultur wurden der STAT3-inhibierte und der DMSO-behandelte TLR4-D299G-Klon mit der Kristallviolett-Färbung auf Unterschiede im Invasionsverhalten untersucht.

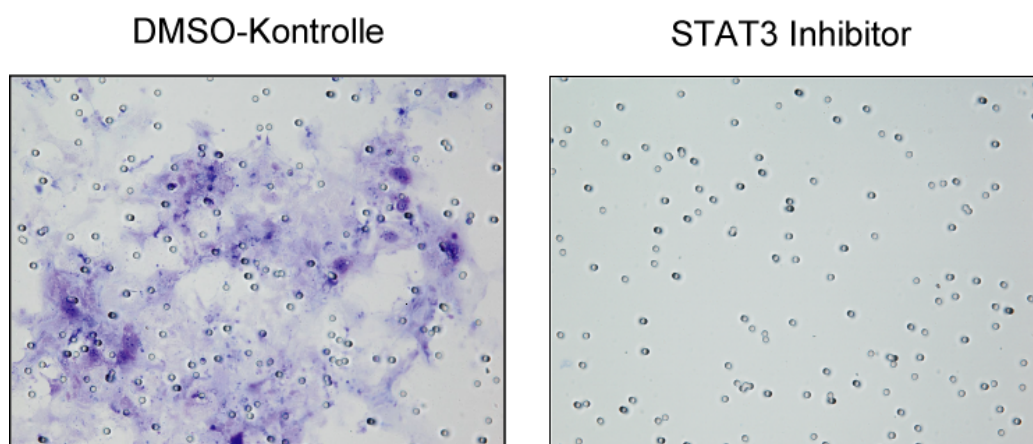


Abb.3.37. Kristallviolett-Färbung von unbehandelten (A) und STAT3-inhibierten TLR4-D299G-Zellen (B). TLR4-D299G-Zellen wurden jeweils im Triplikat mit gleichen Zellzahlen (130.000 Zellen) auf Matrigel®-beschichtete Zellkultureinsätze ausplattiert. Ab Tag eins der Kultur wurde in die Hälfte der Zellen als Lösungsmittelkontrolle DMSO bzw. ein spezifischer STAT3-Inhibitor zugegeben und mit jedem Mediumwechsel erneuert. Nach 8 Tagen Kultur wurden die Kultureinsätze invertiert und mit Kristallviolett auf eingewanderte Zellen gefärbt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ausschnitte der Unterseiten der Zellkultureinsätze von mindestens drei unabhängigen Versuchen (Nikon Eclipse E6000, 4x Vergrößerung).

Der mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO behandelte TLR4-D299G-Klon präsentierte eine vergleichbar große Anzahl an invasiv gewachsenen Zellen wie der zuvor unbehandelte TLR4-D299G-Klon (Abb.3.36.). Nach Inhibition des STAT3-Signalweges zeigte der TLR4-D299G-Klon jedoch kein invasives Wachstum mehr (Abb.3.37.).

Nach Applikation eines COX-2-Inhibitors unter identischen Versuchsbedingungen konnte hingegen keine Inhibition der Invasion des TLR4-D299G-Klons nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivierung des STAT3-Signalweges das invasive Wachstum des TLR4-D299G-Klons spezifisch *in vitro* triggert.

3.4.8. Untersuchung der Tumorentstehung des TLR4-D299G-Klons im Xenograft-Modell *in vivo*

Ob der TLR4-D299G-Klon nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* invasiv wächst, wurde mit dem CD1 *nu/nu* Matrigel®-Xenograft Mausmodell untersucht. CD1 Nacktmäuse besitzen keinen Thymus, können also keine T-Zellen bilden. Die zusätzliche intraperitoneale Applikation des Anti-Asialo GM1 Antikörpers blockiert die NK-Zell-Bildung. Das heißt, diese Tiere besitzen keine Effektorzellen des Immunsystems, sind also immundefizient und als Xenograft-Modell für Caco-2-Zellen geeignet [42] .

Untransfizierte Caco-2-Zellen und die drei TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden mit gleichen Zellzahlen (1×10^6 pro Maus) in PBS in Suspension gebracht. Die Zellsuspension wurde mit flüssigem Matrigel® 1:1 vermischt und den CD1-Nacktmäusen subkutan injiziert. Dabei wurden pro Zellklon drei bis vier Mäuse inokuliert. Zusätzlich wurden diese in fünftägigen Abständen mit dem Anti-Asialo GM1 Antikörper (0,5mg in 500µl PBS) behandelt. Während der dreiwöchigen Inkubationszeit wurde das Tumorwachstum in regelmäßigen Abständen dokumentiert (Abb.3.38.).

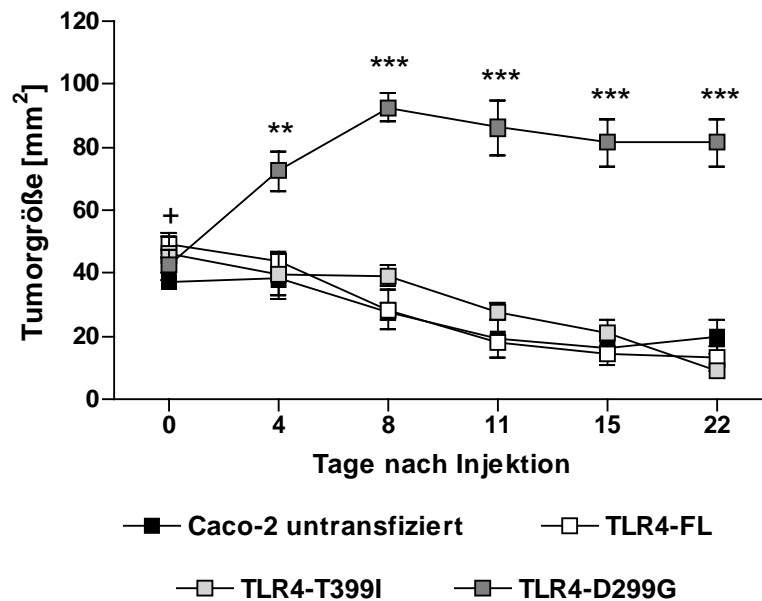


Abb.3.38. Wachstumskinetik der Xenograft-Tumoren. Untransfizierte Caco-2-Zellen und die TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden mit gleichen Zellzahlen (1×10^6 pro Maus) in PBS in Suspension gebracht, 1:1 mit flüssigem Matrigel® vermischt und subkutan in CD1-Nacktmäuse injiziert. Den Mäusen wurde zusätzlich der Anti-Asialo GM1 Antikörper intraperitoneal mit 0,5mg in 500µl PBS alle 5 Tage appliziert, um die NK-Zell-Bildung zu blockieren. Während der dreiwöchigen Versuchsdauer wurde die Tumorgröße in regelmäßigen Abständen gemessen. Die Grafik zeigt die Zusammenfassung von je drei bis vier Mäusen pro Zellklon. Die Daten sind dabei als Mittelwert \pm SEM dargestellt. + $p > 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Bereits nach vier Tagen Versuchsdauer zeigten die Tumore des TLR4-D299G-Klons eine signifikant gesteigerte Größe im Vergleich zu den Tumoren nach Injektion untransfizierter Caco-2-Zellen, bzw. der TLR4-Klone TLR4-FL und TLR4-T399I. Die Tumore des TLR4-D299G-Klons und ihre Signifikanz wuchsen bis Tag 8 des Versuches noch an, blieben dann bis zum Ende des Versuches auf diesem Niveau konstant. Im Gegensatz zu den TLR4-D299G-Klon-Tumoren war in den Tumoren der drei anderen Zellklone kein Wachstum feststellbar, vielmehr nahm ihre Größe während des Versuches ab. Die Tumore untransfizierter Caco-2-Zellen und der TLR4-Klone TLR4-FL und TLR4-T399I zeigten während der gesamten Versuchsdauer untereinander vergleichbare Größen.

Nach Abschluss der dreiwöchigen Versuchsdauer wurden die Tiere getötet. Die Tumore wurden herauspräpariert, für weitere Analysen in Einbettmedium eingebettet und für spätere Gefrierschnitte bei -80°C eingefroren.



Abb.3.39. Dokumentation der TLR4-FL- und TLR4-D299G-Tumore in situ und präpariert. Nach Beendigung des Versuches wurden die Nacktmäuse getötet, die Tumoren herauspräpariert (rechte Seite) und die Tumorgöße dokumentiert. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine Maus mit einem TLR4-FL-Klon-Tumor (obere Maus) und eine Maus mit einem TLR4-D299G-Klon-Tumor (untere Maus). Die Lage der Tumore ist mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Der Größenstandard gibt die Größe in cm an. (IXUS 60, Canon)

Wie in Abb.3.39. an einem Beispiel sichtbar ist, waren die Unterschiede in der Tumorgöße des TLR4-D299G-Klons zum TLR4-FL-Klon visuell klar erkennbar. So wies der Tumor des TLR4-D299G-Klon-Xenografts die ungefähr doppelte Größe der TLR4-FL-Klon-Kontrolltumore auf. Die Tumore nach Injektion von untransfizierten Caco-2-Zellen und des TLR4-T399I-Klons waren in ihrer Größe vergleichbar mit denen nach Injektion des TLR4-FL-Klons.

Zusammenfassend zeigte der TLR4-D299G-Klon *in vivo* ein schnelleres und signifikant größeres Tumorstadium im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen und den beiden TLR4-Klonen TLR4-FL und TLR4-T399I, die im 22-tägigen Versuchsverlauf eine deutliche Regression der initialen Tumorgöße aufwiesen.

3.4.9. Histopathologie der Xenograft-Tumoren

Nach Ablauf der dreiwöchigen Wachstumsphase der Xenograft-Tumoren wurden diese herauspräpariert, eingebettet und Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden für eine Beurteilung der Histopathologie mit H/E angefärbt. Sowohl die Gefrierschnitte als auch die H/E-Färbung wurden arbeitsgruppenintern von Dipl. Biol. Birgit Ey angefertigt.

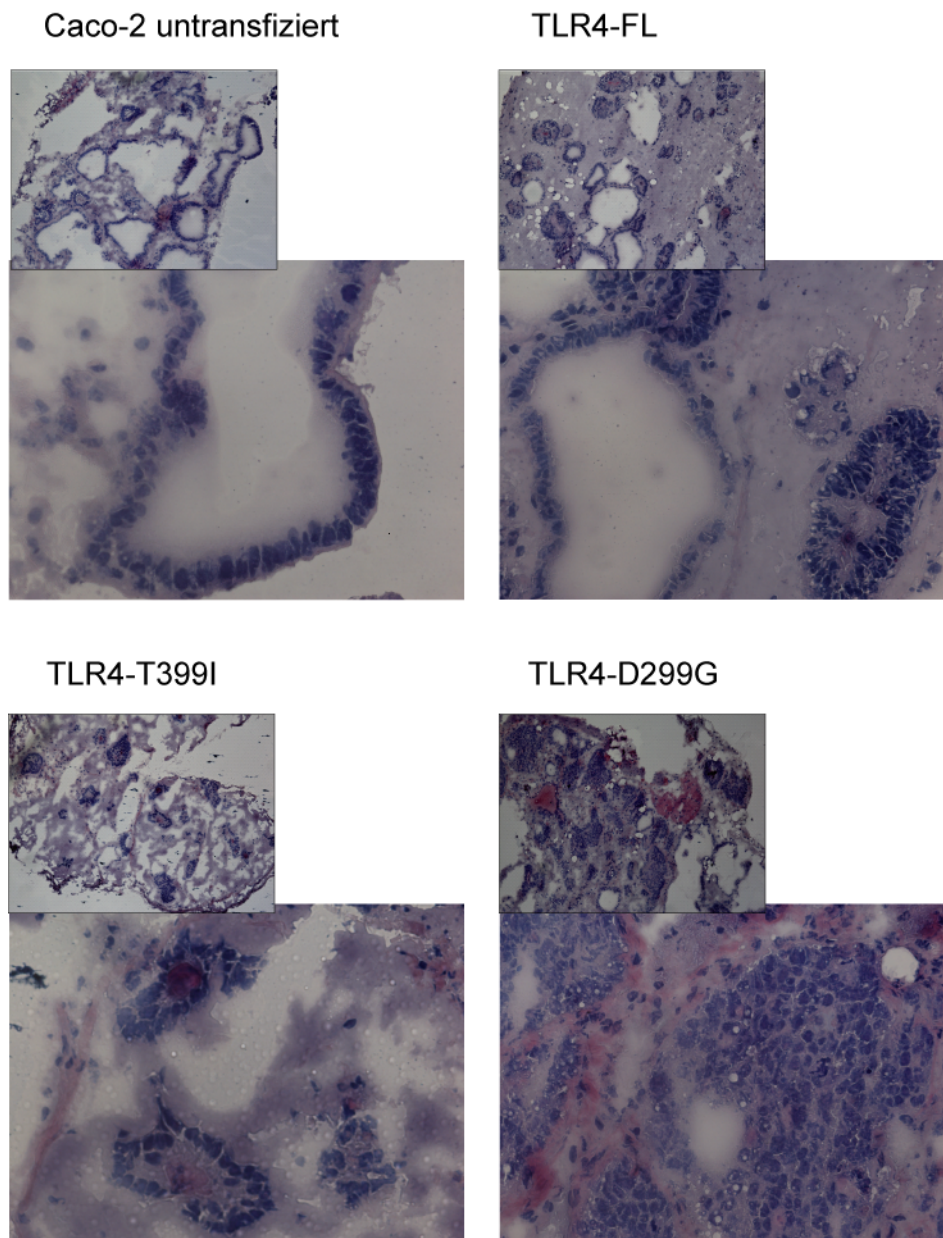


Abb.3.40. Histopathologie der Xenograft-Tumore nach H/E-Färbung. Die präparierten Xenograft-Tumore untransfizierter Caco-2-Zellen und der drei TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in Einbettmedium eingebettet und Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden dann in einer H/E-Färbung auf ihre Histopathologie untersucht. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ausschnitte der Präparate von mindestens drei Mäusen pro Zellklon. Das kleinere Bild gibt dabei jeweils einen Überblick über den Gefrierschnitt (Nikon Eclipse E6000, 4x Vergrößerung), während die größere Abbildung einen Bildausschnitt detaillierter darstellt (Nikon Eclipse E6000, 20x Vergrößerung).

Die Xenograft-Tumore von untransfizierten Caco-2-Zellen und den beiden TLR4-Klonen TLR4-FL und TLR4-T399I zeigten in der H/E-Färbung ausdifferenzierte, geordnete säulenförmige Zellen (Abb.3.40.). Dieses Wachstumsmuster lässt sich mit dem die Zellen umhüllenden Matrigel® erklären. Bietet dieses den Zellen eine Matrix, so zeigen Caco-2-Zellen diesen Phänotyp [69]. Ein Hinweis auf invasives Wachstum

war in den Präparaten der untransfizierten Caco-2 und der TLR4-Klone TLR4-FL und TLR4-T399I nicht sichtbar.

Im Gegensatz dazu zeigten die Tumore des TLR4-D299G-Klons ungeordnete und undifferenzierte Zellen. Dabei war die Zelldichte in diesen Tumoren deutlich höher als in den anderen drei Präparaten (Abb.3.40. unten rechts). Dies erklärt den zuvor dokumentierten größeren Umfang der Tumore des TLR4-D299G-Klons. Das Präparat des TLR4-D299G-Klons zeigte in dieser Abbildung exemplarisch Invasionsverhalten, d.h. in eine Muskelschicht des umliegenden Gewebes eingewanderte Zellen.

Die Gefrierschnitte wurden zur weiteren Überprüfung des vorliegenden Zelltyps mit einem Anti-Pan-Zytokeratin-Antikörper in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung angefärbt und am Laser Scanning Mikroskop ausgewertet. Zytokeratine werden von epithelialen Zellen gebildet und repräsentieren als Intermediärfilamente den wichtigsten Teil des Zytoskeletts. Dementsprechend bietet die Zytokeratin-Färbung den spezifischen Nachweis epithelialer Zellen in den subkutanen Xenograft-Präparaten.

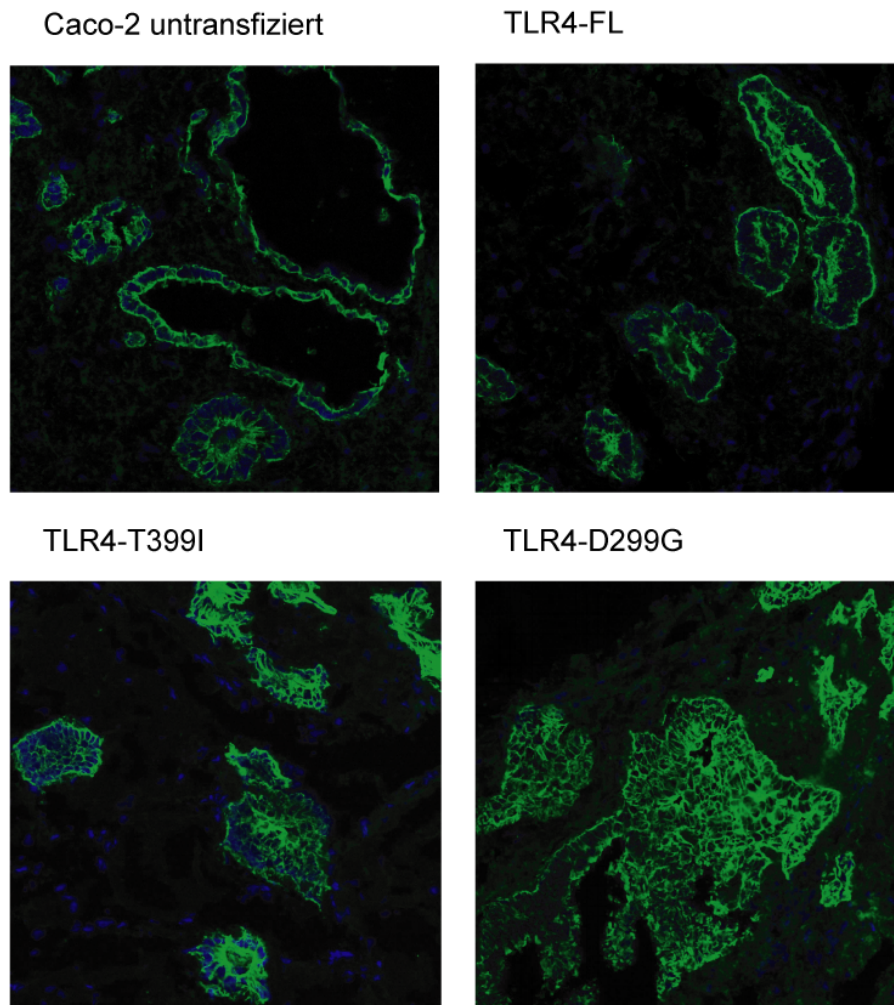


Abb.3.41. Immunfluoreszenzfärbung für Pan-Zytokeratin der Xenograft-Tumore. Die präparierten Xenograft-Tumore untransfizierter Caco-2-Zellen und der drei TLR4-Klone TLR4-FL, TLR4-T399I und TLR4-D299G wurden in Einbettmedium eingebettet und Gefrierschnitte angefertigt. Mit diesen wurde dann eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung für Pan-Zytokeratin (AlexaFluor® 488, grün) durchgeführt und am Laser Scanning Mikroskop (Plan-Apochromat 20x/0,75, Scan Zoom 1,0) ausgewertet. Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Bildausschnitte der Präparate. Pro Zellklon wurden drei bis vier Mäuse ausgewertet.

In dieser Färbung bestätigte sich die deutlich höhere Dichte an undifferenzierten, ungeordneten IEC in Tumoren des TLR4-D299G-Klons (Abb.3.41.). Tumore von untransfizierten Caco-2-Zellen und den TLR4-Klonen TLR4-FL und TLR4-T399I zeigten wie in der H/E Färbung geordnete Zellverbände mit kryptenähnlichen, kubischen Zellen.

Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass der TLR4-D299G-Klon deutlich progressiver wächst und einen malignen Phänotyp mit invasivem Wachstum *in vivo* aufweist.

4. Diskussion

Das intestinale Epithel bildet die erste mechanische und immunologische Barriere des mukosalen Immunsystems des Darms. Bei einer Verletzung des Epithels, wie in CED durch Entzündungen, müssen verschiedene Wundheilungsmechanismen (z.B. Proliferation, Zell-Zell-Kommunikation und Restitution) schnell greifen, um die Barriereintegrität und die mukosale Homöostase schnellstmöglich wiederherzustellen. Des Weiteren könnten langanhaltende intestinale Entzündungen auch zur Entstehung eines Colonkarzinoms führen.

Die funktionellen und phänotypischen Auswirkungen der TLR2- und TLR4-Genvarianten TLR2-R753Q, TLR4-D299G und TLR4-T399I in bestimmten Zelltypen der intestinalen Mukosa und im Zusammenhang mit CED sind bisher ungeklärt. Die vorliegende Arbeit bietet mit Transfektionsstudien der Plasmide pUNO-TLR2-FL, pUNO-TLR2-R753Q, pUNO-TLR4-FL, pUNO-TLR4-D299G und pUNO-TLR4-T399I in der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 erste Einblicke in die spezifischen funktionellen und molekularen Auswirkungen dieser TLR-Polymorphismen im intestinalen Epithel. Die intestinale Epithelzelllinie Caco-2 wurde hier gewählt, da sie ein anerkanntes, gängiges Modellsystem für das intestinale Epithel darstellt [156].

4.1. Einfluss von TLR2 und des Colitis ulcerosa-assoziierten Polymorphismus TLR2-R753Q auf die Homöostase und Restitution der intestinalen Epithelbarriere

In der Regulation der Barriereintegrität und Wundheilung spielt TLR2 eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Überexpression von TLR2-FL in der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 positiv auf die Differenzierung der IEC auswirkte. TLR2 schützte außerdem die Barriereintegrität der ausdifferenzierten IEC, u.a. durch Induktion der Proliferation und metabolische Aktivität der Zellen. Des Weiteren förderte die konstitutive Überexpression von TLR2 verschiedene Wundheilungsmechanismen. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Zell-Zell-Kommunikation über "*gap junctions*" und eine effektivere und schnellere Migration der Zellen nach Verwundung des Monolayers. Zusätzlich wurde TFF3, ein Hauptregulator der intestinalen Wundheilung, in TLR2-überexprimierenden IEC konstitutiv produziert und sekretiert.

In einer vorangegangenen Studie wurde der TLR2-R753Q-Polymorphismus als eine dominant-negative Mutation beschrieben [106]. In mit TLR2-R753Q-Plasmid transient transfizierten 293T-Zellen, einer Variante von HEK293-Zellen (*Human Embryonic Kidney Zellen*), wurde keine Erhöhung der NF- κ B-Aktivität auf Stimulation mit zwei synthetisch hergestellten bakteriellen TLR2-Peptiden aus *Borrelia burgdoferi* und *Treponema pallidum* nachgewiesen [106]. Es wird somit vermutet, dass TLR2 durch die R753Q-Mutation in seiner Tertiärstruktur gestört ist und spezifische Liganden nicht oder nur mit geringerer Affinität binden können [106]. Aufgrund des möglichen Verlustes der Ligand-Rezeptor-Reaktion löst die TLR2-R753Q-Mutante so keine Signaleffekte aus.

Der Funktionsverlust der TLR2-R753Q-Mutation in IEC wurde in der vorliegenden Arbeit durch verschiedene Wundheilungsstörungen und ihre Mechanismen erstmalig beschrieben. Zur näheren Charakterisierung wurde das TLR2-R753Q-Plasmid hier in eine humane intestinale Epithelzelllinie eingebracht, die den Wildtyp-TLR2 konstitutiv exprimiert [24]. Damit repräsentiert dieses *in vitro* Transfektionsmodell mit Caco-2-Zellen annähernd den im Menschen meist vorliegenden heterozygoten Status der TLR2-R753Q-Mutation. Der leere Grundvektor pUNO konnte nicht stabil in die Caco-2-Zellen integriert werden, da er weder das Blastizidin-Resistenzgen zur Selektion noch das HA-Tag zur Identifizierung enthält, so dass nur eine transiente Transfektion der Zellen mit pUNO möglich war. Als adäquate Kontrollen für den TLR2-R753Q-Klon wurden in diesem Modell daher der TLR2-FL-Klon (mit demselben Grundvektor pUNO) und untransfizierte Caco-2-Zellen eingesetzt.

Die Höhe der Expression der beiden Transgene TLR2-FL und TLR2-R753Q waren in dieser Arbeit vergleichbar mit anderen Transfektionsstudien [121]. Die vergleichbar niedrige Expression des TLR2-FL-Plasmids im TLR2-FL-Klon könnte mit der konstitutiven, endogenen Expression des Rezeptors in der Caco-2-Zelllinie erklärt werden. Das Transgen könnte aufgrund der konstitutiven TLR2-Expression der Zellen abgebaut oder aus der Zelle geschleust werden. Der TLR2-R753Q-Klon wies hingegen eine höhere Proteinexpression des Transgens auf. Hierfür könnte zum Einen eine verstärkte Nachproduktion verantwortlich sein, da die Zelle den mutierten Rezeptor eventuell in seiner Faltung als defekt ansieht. Zum Anderen könnte die hier beschriebene Störung des Proteasoms durch die TLR2-R753Q-Mutante zu einem unvollständigen Abbau des defekten TLR2-R753Q-Rezeptors führen.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Fähigkeit der Ausdifferenzierung der TLR2-Klone TLR2-FL und TLR2-R753Q im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen untersucht. Dabei wirkte sich die Überexpression von TLR2-FL positiv auf die Differenzierung aus. Dies wurde sowohl durch die TER-Daten (Abb.3.3) als auch durch eine signifikant erhöhte SI-Genexpression belegt (Abb.3.4.). Die Differenzierung von IEC zeichnet sich durch die zunehmende Polarisierung der Zellen und der Integrität des gebildeten Epithels über feste Zell-Zell-Verbindungen, den "*tight junctions*", aus. Mit der Messung des TER kann *in vitro* die Integrität des Monolayers bestimmt werden. Dabei ist der TER ein physiologischer und physikalischer Messwert, der wiederum Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad der IEC zulässt [156]. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung von TLR2 mit dem spezifischen Liganden PCSK zu einem Anstieg des TERs in Caco-2-Zellen führt [24]. Dieser Anstieg des TERs wurde über zwei Isoformen der Proteinkinase C (PKC α/δ) vermittelt, die durch PCSK aktiviert wurden. Dieser Effekt auf die Barriereintegrität korrelierte mit einer Verlagerung des zentralen "*tight junction*"-Proteins ZO-1 an den apikalen Pol der IEC [24].

Hier konnte gezeigt werden, dass im TLR2-R753Q-Klon im basalen Zustand kein Unterschied zu untransfizierten Caco-2-Zellen und dem TLR2-FL-Klon im TER feststellbar war. Somit beeinflusste der mutierte Rezeptor nicht die Differenzierungsfähigkeit von Caco-2-Zellen. Erst nach Stimulation mit PCSK wurde ein Unterschied zwischen dem TLR2-FL-Klon und dem TLR2-R753Q-Klon sichtbar. Der mutierte Rezeptor reagierte nicht auf PCSK und zeigte somit keinen Anstieg im TER (Abb.3.3.). Zuvor wurde gezeigt [24], dass es bei einem Verlust der TLR2-Funktion durch die transiente Transfektion des Rezeptors mit einer Deletion der intrazellulären Domäne nicht zu einer verminderten Barrierefunktion in unstimulierten Caco-2-Zellen kommt. Dies bestätigt die Annahme, dass es durch die TLR2-R753Q-Mutation zu einem Funktionsverlust des TLR2 kommt und es sich hierbei funktionell um eine dominant-negative "*loss-of-function*" Mutation in IEC handelt.

In *In-vivo*-Mausmodellen wurde vor Kurzem ein protektiver Effekt des aktivierten TLR2 in der Wundheilung im intestinalen Epithel nachgewiesen [29]. Durch die Applikation von DSS kann in Mäusen eine akute distale Colitis induziert werden, die als toxisches Schädigungsmodell des intestinalen Epithels eine sekundäre Entzündungsreaktion der Mukosa auslöst [186]. Dies wird sehr vereinfacht mit

einigen Aspekten humaner Colitis ulcerosa verglichen. Wurden Mäuse nach der DSS-Colitisinduktion oral mit PCSK im Trinkwasser behandelt, waren die Entzündungszeichen deutlich reduziert und die Wundheilung beschleunigt [28]. Das intestinale Epithel wurde zunächst durch die chemisch-induzierte Verletzung mit DSS in seiner Integrität geschwächt und durchlässig. Die Stimulation mit PCSK stärkte die *"tight junction"*-assoziierte Integrität des Epithels und milderte die mukosale Entzündung [28].

Mäuse, die im TLR2-Gen defizient sind, reagierten besonders empfindlich auf die DSS-Colitis mit erhöhter Morbidität und Mortalität [28, 141]. Im Einzelnen führte dies zu einem frühen Verlust des *"tight junction"*-Proteins ZO-1 [28]. Dieser Verlust war nur in der intestinalen Epithelbarriere, nicht aber in den darunter liegenden Mukosaschichten manifest. Im weiteren Verlauf der Colitis kam es zur vermehrten Zell-Apoptose in der Darmwand, wodurch die mukosale Barrierefunktion insgesamt geschwächt wurde. Durch die zunehmende Permeabilität des Epithels konnten kommensale Bakterien in die unteren Schichten der Lamina Propria eindringen. Dadurch kam es wahrscheinlich zur Exazerbation der akuten Entzündungsreaktionen bei DSS-Colitis. Diese Daten zeigten eine maßgebliche Beteiligung von TLR2 an einer erfolgreichen mukosalen Wundheilung [28].

In primären gesunden humanen und murinen IEC war eine Expression von TLR2 kaum detektierbar [21]. Nach Induktion einer DSS-Colitis in Wildtyp-Mäusen wurde die TLR2-mRNA-Expression in IEC signifikant hochreguliert [127]. In humanen Epithelzellen von Colitis ulcerosa-Patienten war jedoch keine Hochregulation des TLR2-Proteins während der Entzündung nachweisbar [21]. Dies könnte zum Einen damit erklärt werden, dass DSS eine chemisch-induzierte Verletzung auslöst und nicht vollständig übertragbar auf den komplexen Krankheitstyp der humanen Colitis ulcerosa ist. Zum Anderen könnte diese Beobachtung aus einer *"loss-of-function"* Mutation von TLR2 in einem Teil der Colitis ulcerosa-Patienten resultieren.

Vor Kurzem wurde der TLR2-R753Q-Polymorphismus mit einem besonders schweren Krankheitsphänotyp der Colitis ulcerosa, der Pancolitis, in einer unizentrischen Studie, die eine belgische Population untersucht, assoziiert [134]. Wenn man die Daten der vorliegenden Arbeit und der vorangegangenen Studien zusammengefasst analysiert, liegt die Vermutung nahe, dass die TLR2-R753Q-Mutation die Pancolitis funktionell bei einer Colitis ulcerosa triggern könnte. In der vorliegenden Arbeit konnten für die TLR2-R753Q-Mutation erstmalig

schwerwiegende Wundheilungsstörungen in einem humanen IEC-Modell nachgewiesen werden, die so die chronischen Entzündungsreaktionen bei einer humanen Pancolitis erklären könnten.

Im Einzelnen zeigte der TLR2-R753Q-Klon schwere Defizite in der Zell-Zell-Kommunikation nach Verwundung (Abb.3.10.). Dies ist mit dem Verlust des Cx43-Proteins im TLR2-R753Q-Klon zu erklären (Abb.3.8. und Abb.3.9.). Dabei wurde die Cx43-Synthese nicht bereits in der Transkription inhibiert, da hohe Mengen Cx43-mRNA nachweisbar waren (Abb.3.7.). Vielmehr könnte durch die Überexpression des mutierten Rezeptors das Proteasom übermäßig aktiviert werden, oder aber in seinem Aufbau gestört sein. Dadurch kam es wahrscheinlich zu einem erhöhten posttranslationalen Abbau des Cx43-Proteins, welches dann kaum mehr detektierbar war. Die erhöhte Cx43-mRNA-Expression im TLR2-R753Q-Klon stellte so eventuell einen Kompensationsmechanismus auf den gesteigerten Proteinabbau dar. Bestätigt wurde dies durch die wiederhergestellte Cx43-Synthese nach chemischer Blockade des Proteasoms mit einem spezifischen Inhibitor. Auch die Zell-Zell-Kommunikation über "*gap junctions*" war nach der Inhibition des Proteasoms in TLR2-R753Q-Zellen wieder hergestellt (Abb.3.11.).

Neben dem Ubiquitin-Proteasom-abhängigen Signalweg ist in der Proteolyse von Cx43 auch das Endoplasmatische Retikulum wichtig [97, 102] - aber eine zusätzliche Beteiligung des ER konnte hier ausgeschlossen werden (Abb.3.12.). "ER-Stress" ist vor Kurzem mit intestinalen Entzündungen assoziiert worden und kann durch "*misfolding*" von Proteinen induziert werden [85, 158]. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass die TLR2-R753Q-Zellen nicht unter "ER-Stress" waren. Dementsprechend schien vor allem ein fehlreguliertes Proteasom für den Cx43-Proteinabbau im TLR2-R753Q-Klon verantwortlich zu sein.

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass die Aktivität des Proteasoms die Homoöstase der intestinalen Mukosa kontrolliert [180]. Eine gestörte Proteasomaktivität könnte demnach intestinale Entzündungen in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen triggern [180]. In manchen CED-Patienten konnte bereits während einer akuten Entzündung eine Reduktion von Cx43-Protein im Darm nachgewiesen werden [100]. Bezieht man die Daten dieser Arbeit hinzu, so könnte ein veränderter Aufbau oder eine veränderte Aktivität des Proteasomkomplexes durch die TLR2-R753Q-Mutation die Cx43-Reduktion begründen. Vor Kurzem wurde der Proteasom-Inhibitor Bortezomib therapeutisch im akuten DSS-Colitismodell

eingesetzt und zeigte eine deutliche Reduktion der Entzündungszeichen [153]. In der Therapie von humanen CED wird Bortezomib allerdings noch nicht eingesetzt. Weitere Untersuchungen müssen einen möglichen Einsatz von Bortezomib oder eines anderen Proteasom-Inhibitors (und mögliche Nebenwirkungen) und dessen Wirkung auf Wundheilungseffekte durch mangelnde Zell-Zell-Kommunikation bei Cx43-Reduktion in weiteren murinen Colitismodellen abklären.

Ein hyperaktives Proteasom im TLR2-R753Q-Klon könnte auch über den verstärkten Abbau von Zellzyklusregulatorproteinen für die signifikant verminderte Proliferation und metabolische Aktivität des TLR2-R753Q-Klons verantwortlich sein (Abb.3.5. und Abb.3.6.). Das Proteasom ist in Eukaryoten ein essentieller Mechanismus für den Abbau von Proteinen. Beispiele hierfür sind unter anderem Transkriptionsfaktoren und Proteine der Zellzyklusregulation [39]. Die vorliegende Arbeit kann nicht ausschließen, dass diese Faktoren ebenfalls durch eine Proteasom-Degradierung in TLR2-R753Q-IEC fehlreguliert werden.

Neben der defekten Zell-Zell-Kommunikation wurde im TLR2-R753Q-Klon eine TFF3-Defizienz festgestellt (Abb.3.12.), die auch durch das hyperaktive Proteasom bedingt sein könnte. TFF3 ist ein Hauptregulator der IEC-Wundheilung, insbesondere der Restitution, [169] und wird in Becherzellen gebildet. *In vivo* Studien zeigten, dass TFF3-defiziente Mäuse einen Becherzelldefekt haben. Diese Mäuse waren in verschiedenen Colitismodellen äußerst anfällig für eine chemisch-, strahlungs- oder hypoxie-induzierte Verwundung des Colons. Dies war vor allem durch eine defekte Wundheilung und Zellmigration zu erklären [16, 63, 113].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TLR2-FL zu einer konstitutiven TFF3-Synthese und anschließender Sekretion führte (Abb.3.12. und Abb.3.13.). Hier wurde keine reine Becherzelllinie verwendet, sondern die enterozyten-ähnliche intestinale Epithelzelllinie Caco-2 [70]. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob weitere Eigenschaften von Becherzellen in Caco-2-Zellen, die das TLR2-FL-Plasmid überexprimieren, dominieren.

In-vitro- und *Ex-vivo*-Studien von murinen und humanen Becherzellen ergaben eine Beteiligung von TLR2 an der TFF3-Synthese [136]. Eine Aktivierung von TLR2 durch seinen spezifischen Liganden PCSK induzierte dabei die TFF3-Synthese in den Becherzellen [136]. Dabei könnte die Transkription von TFF3 über die beiden Signalwege Ras/MEK/MAPK ("*Rat sarcoma/Mitogen-activated ERK-kinase/Mitogen-activated protein kinase*") und PI3K/Akt ("*Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase*")

B") aktiviert sein [46, 168], die auch in die Signaltransduktion über TLR2 eingebunden sind [22, 28]. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob die TLR2-R753Q-Mutation diese Signalwege spezifisch blockiert.

Studien mit TFF3- und TLR2-defizienten Mäusen zeigten, dass die Aktivierung von TLR2 durch PCSK auch *in vivo* die TFF3-Synthese moduliert [136]. Dabei führte die Aktivierung von TLR2 im akuten DSS-Colitismodell bei WT-Mäusen zu einer Suppression der Apoptose in der Mukosa [28]. Dieser Effekt wurde essentiell über TFF3 vermittelt und reguliert. In TFF3-defizienten Mäusen mit einer DSS-Colitis konnte die Applikation von PCSK zu keiner Abschwächung der Entzündung führen [136]. Ein TLR2-vermittelter antiapoptotischer Schutz war ebenfalls in diesem Mausmodell nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu kam es zu einer verzögerten Wundheilung und einer Verstärkung der Entzündung. Lediglich die Barriereintegrität über ZO-1 wurde geschützt. Wurden im Gegensatz dazu TLR2-defiziente Mäuse nach DSS-Colitisinduktion mit rekombinanten TFF3 über das Trinkwasser behandelt, war die Entzündung abgeschwächt. Die Mäuse konnten sich deutlich schneller und besser erholen. Dementsprechend ist der mukosa-protektive, antiapoptotische Effekt von TLR2 vor allem über TFF3 vermittelt [136].

Dieser zellprotektive Effekt von TLR2 konnte auch in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden. Die Überexprimierung von TLR2 in der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 führte zu einer schnelleren und effektiveren Wundheilung durch die konstitutive Produktion und Sekretion von TFF3. Im Gegensatz dazu konnte hier erstmalig gezeigt werden, dass der Funktionsverlust von TLR2 bei dem R753Q-Polymorphismus im intestinalen Epithel zu einem Verlust von TFF3 führt.

Dadurch konnte der TLR2-R753Q-Klon keine ausreichende Restitution nach Verwundung zeigen (Abb.3.14.). In Colitis ulcerosa-Patienten mit der Mutation könnte das gestörte Restitutionsverhalten durch den TFF3-Mangel so zu dem schwereren Krankheitsphänotyp der Pancolitis beisteuern.

TLR2 muss für eine erfolgreiche Signaltransduktion mit TLR1 oder TLR6 dimerisieren. Das TLR2/TLR1-Heterodimer ist für die Erkennung des synthetischen, hier verwendeten spezifischen Liganden PCSK verantwortlich [167]. Die Rolle von TLR1 und möglichen zusätzlichen TLR1-Polymorphismen in der Signaltransduktion in Zellen mit der TLR2-R753Q-Mutation ist aber nicht Bestandteil dieser Arbeit und muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

Überträgt man die Daten dieser humanen Transfektionsstudie und aus den vorangegangenen Mausmodellen, so scheint es sinnvoll zu sein, Colitis ulcerosa-Patienten auf die TLR2-R753Q-Mutation zu untersuchen. In verschiedenen Studien konnte die TLR2-R753Q-Mutation mit einem schwereren Krankheitsverlauf der Colitis ulcerosa [134], einem gesteigerten Risiko für eine Cytomegalovirus (CMV)-Infektion [19] und für atopische Dermatitis [93] assoziiert werden. Ob diese Assoziationen nur studien- oder populationsabhängig sind, müssen größere, multizentrische Studien analysieren. Auffällig ist aber, dass es sich bei den bisher assoziierten Krankheiten um Störungen verschiedener Organbarrieren handelt. Sowohl die Haut als auch das Darmepithel bilden die ersten mechanischen und immunologischen Barrieren des Körpers in verschiedenen Kompartimenten. Treten hier Störungen der Barriereintegrität auf, so kann es zu starken Entzündungen der darunter liegenden Schichten kommen. In Verbindung mit der CMV-Assoziation der TLR2-R753Q-Mutation könnte man vermuten, dass die Mutation möglicherweise Infektionen von opportunistischen Keimen fördert, die wiederum die Entzündung triggern. Im Kontext einer Colitis ulcerosa könnten solche opportunistischen Keime einen Schub der Krankheit auslösen oder verstärken [131].

Weitere Untersuchungen in einer Studie mit CED-Patienten müssen auch abklären, ob in Colitis ulcerosa-Patienten ein Zusammenhang der TLR2-R753Q-Mutation und der Expression von Cx43 und TFF3 besteht. Die *In-vitro*-Daten der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass Colitis ulcerosa-Patienten mit dem TLR2-R753Q-Polymorphismus eine niedrigere Cx43-Proteinexpression aufweisen könnten. Des Weiteren könnten diese Patienten durch einen Becherzelldefekt einen TFF3-Mangel besitzen. Diese Kombination aus fehlender Zell-Zell-Kommunikation über das "*gap junction*"-Protein Cx43 und einem akuten TFF3-Mangel könnte die schweren Krankheitssymptome einer humanen Pancolitis ulcerosa im Zusammenhang mit der TLR2-R753Q-Mutation erklären.

Durch die genetische Untersuchung der Colitis ulcerosa-Patienten könnten sich möglicherweise neue, individuell abgestimmte Therapiemöglichkeiten ergeben. Im Falle des TLR2-R753Q-Polymorphismus im Patienten wäre TLR2 vermutlich funktionslos und der Zustand damit vergleichbar mit einer TLR2-Defizienz. Wie zuvor schon erwähnt, konnte die orale Gabe von rekombinantem TFF3 im DSS-Colitismodell mit TLR2-defizienten Mäusen die Entzündungserscheinungen deutlich abmildern [136]. Zusätzlich wirkte TFF3 antiapoptotisch und verhinderte in diesem *In-*

vivo-Modell massive Leukozyteninfiltrationen. Diese Daten und ein möglicher Mangel an TFF3 in Colitis ulcerosa-Patienten mit der TLR2-R753Q-Mutation legen die Hypothese nahe, dass die Applikation von rekombinanten TFF3 in diesen Patienten entzündungshemmend und wundheilungsfördernd wirken könnte. TFF3 wurde in klinischen Studien mit guter Verträglichkeit eingesetzt, allerdings sind die Ergebnisse widersprüchlich. Dies könnte mit unterschiedlichen Applikationsmethoden erklärt werden, die noch weiter optimiert werden müssen [110, 132].

Trägt ein Colitis ulcerosa-Patient dagegen den Wildtyp-TLR2, so könnte es sinnvoll sein, den funktionellen Rezeptor mit seinem spezifischen TLR-Liganden PCSK zu stimulieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexprimierung von TLR2-FL sowohl zu einer Stärkung der Barriereintegrität als auch einer Förderung der Zell-Zell-Kommunikation und der Wundheilung *in vitro* führt. Im *In-Vivo*-DSS-Colitismodell war die orale Gabe von PCSK ebenfalls wundheilungsfördernd [136]. Dabei ist der Aufnahmeort von PCSK bei dieser Applikation im Gastrointestinaltrakt allerdings noch unklar. PCSK wurde den Mäusen oral über das Trinkwasser verabreicht, wobei es noch keine Daten über die pH-Sensitivität und den intestinalen Transport des synthetischen Lipopeptids gibt. Eine mögliche Degradierung im sauren pH-Bereich des Magens oder sekundäre Effekte können nicht ausgeschlossen werden. Unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass die orale Gabe von PCSK zu einer Hochregulation der TLR2-Proteinexpression im Colonepithel der Mäuse führt, so dass ein direkter Effekt nahe liegt.

Ein erster Schritt in der Übertragung der PCSK-Daten aus den Mausmodellen auf den Menschen und zu einem möglichen Einsatz von PCSK in der Therapie wurde von unserer Gruppe bereits mit der *ex vivo* Kultivierung primärer IEC unternommen [49]. Primäre IEC sind schwierig in Kultur zu nehmen, und eine Kultivierung über 2-3 Tage ist aufgrund der hohen Apoptoserate problematisch. Humane IEC exprimieren TLR2, der im Colonepithel nach PCSK-Stimulation hochreguliert wird [49]. Die primären IEC wurden in einem 3D-Matrigel®-Modell *ex vivo* für 4h kultiviert. Nach Ablauf der 4h erschienen die einzelnen Zellen abgeflacht, ohne erkennbare Polarisation und eine "gap junction/tight junction"-Ringformation war nicht mehr sichtbar. Dementsprechend war die funktionelle Integrität des Epithels schon nach 4h Kultivierung fast völlig zerstört. Wurden die humanen IEC aber zusätzlich mit dem TLR2-Liganden PCSK in diesem Modell kultiviert, so zeigte sich ein deutlich

besseres Bild nach Ablauf der 4h [49]. Die *"gap junction/tight junction"* -Ringformation war weitestgehend intakt und die einzelnen Zellen polarisiert. Merkmale eines funktionellen Epithels waren vorhanden, während dies in unstimulierten Zellen nicht der Fall war [49].

Auch dies spricht dafür, dass PCSK in Patienten mit einem funktionellen Wildtyp-TLR2 zellprotektiv wirken könnte. Allerdings gibt es noch keine Daten über mögliche Nebenwirkungen von PCSK. Eine längere Behandlung mit dem TLR2-Liganden könnte neben positiven auch negative Auswirkungen haben [30]. Durch eine andauernde, systemische Stimulation des Rezeptors könnte das Immunsystem des Patienten in einen dauerhaft aktivierten Zustand versetzt werden. Dies könnte wiederum chronische Autoimmunerkrankungen auslösen. Des Weiteren ist derzeit noch nicht geklärt, ob und wie PCSK die Tumorgenese beeinflusst [91]. Ein weiteres Problem im therapeutischen Einsatz von TLR2-Liganden könnte das zellabhängige Expressionsmuster und Aktivierungsverhalten über verschiedene Signalwege der TLRs sein. Zusätzlich könnten TLR2-Liganden abhängig von der Applikationstechnik und vom Entzündungsstatus (akut oder chronisch) des Patienten unterschiedliche Immunreaktionen auslösen. Während TLR2-Liganden in Epithelzellen entzündungshemmend wirken, könnten sie in der darunter liegenden Lamina Propria Entzündungsreaktionen auslösen [29].

Daher bieten TLR2-Liganden zwar therapeutisch vielversprechende Einsatzmöglichkeiten - ihr Einsatz muss allerdings sehr fein auf den Krankheitsstatus und den Zelltyp abgestimmt werden.

Zusammenfassend konnte im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit somit gezeigt werden, dass TLR2 die Barrierefunktion in intestinalen Epithelzellen *in vitro* entscheidend reguliert. Durch die *"loss-of-function"* Mutation des TLR2-Polymorphismus R753Q ist die Barriereregulation in intestinalen Epithelzellen gestört. In dieser Arbeit wurden verschiedene molekulare und zellbiologische Mechanismen und funktionelle Folgen dieser TLR2-Störung erstmalig in IEC identifiziert, die möglicherweise eine pathophysiologische Relevanz für einen Teil der Colitis ulcerosa-Patienten haben.

4.2. Morphologische und funktionelle Charakterisierung von TLR4-FL und den CED-assoziierten Polymorphismen TLR4-T399I und TLR4-D299G im intestinalen Epithel

TLR4 ist ein anderer Toll-like-Rezeptor, der im gesunden intestinalen Epithel und im Kontext von akuter Entzündung bei CED eine weitere wichtige Rolle zu spielen scheint [31]. Wie für TLR2, sind für TLR4 genetische Variationen identifiziert worden, die mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert wurden [57]. Der TLR4-D299G-Polymorphismus ist in einigen Populationen, z.B. in einer belgischen und einer neuseeländischen Population, signifikant mit CED assoziiert worden [43, 57, 77], der TLR4-T399I-Polymorphismus hingegen nur in vereinzelt Studien [157]. In CED-Patienten ist die Frequenz beider Polymorphismen mit 10-12% höher als in der Normalbevölkerung (6-10%).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich nach der stabilen Überexpression des pUNO-TLR4-D299G-Plasmids in der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 phänotypische Auswirkungen. Die Morphologie des TLR4-D299G-Klons erinnerte dabei an maligne entartete Tumorzellen (Abb.3.16). Dieser Effekt war nicht nur auf diesen einen Klon beschränkt, sondern konnte auch in mindestens drei weiteren TLR4-D299G-Zelllinien, die eine niedrigere Expression des Transgens aufwiesen, beobachtet werden. Die Bildung des Aktinzytoskeletts war im TLR4-D299G-Klon – und auch in den drei anderen TLR4-D299G-Zelllinien – verändert. Die Aktinfilamente erschienen im TLR4-D299G-Klon gebündelt, verdichtet und ungeordnet (Abb.3.17.). Diese morphologischen Beobachtungen einer möglichen malignen Entartung der TLR4-D299G-Zellen wurden durch die Analyse der Mitosen bestätigt, in denen Störungen des Zellteilungsablaufes im TLR4-D299G-Klon sichtbar wurden (Abb.3.20.). Einige TLR4-D299G-Zellen zeigten hierbei bis zu 6 Spindelpole, so dass aus einer Zelle bis zu 6 Tochterzellen entstehen könnten.

Zusätzlich waren im TLR4-D299G-Klon wesentliche Gene von Entzündungsmediatoren (Abb.3.24.), Gerinnungsfaktoren (Abb.3.26.) und der Komplementkaskade (Abb.3.28.) konstitutiv erhöht. Dies legt nahe, dass die Überexpression von TLR4-D299G in den Zellen den Status einer andauernden Entzündung ausgelöst hat. Der zusätzliche Cx43-Mangel könnte zu einer Schwächung der Barrierefunktion der intestinalen Epithelzelllinie durch eine mögliche

fehlerhafte Zell-Zell-Kommunikation im TLR4-D299G-Klon führen - wie zuvor im ersten Teil der Arbeit für den TLR2-R753Q-Klon gezeigt wurde.

Langanhaltende Entzündungen können zur Tumorentstehung führen, so haben z.B. CED-Patienten ein höheres Risiko Colonkarzinome zu entwickeln [94], sogenannte Colitis-assoziierte Colonkarzinome.

In der vorliegenden Arbeit zeigte der TLR4-D299G-Klon entscheidende Eigenschaften einer Tumorzelle mit einem gestörten Zellteilungsablauf und dem Potential zum invasiven Wachstum *in vitro* (Abb.3.36.) und *in vivo* im Xenograftmodell (Abb.3.38.). Untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR4-FL-Klon und der TLR4-T399I-Klon zeigten keine dieser Eigenschaften.

Vor Kurzem konnte in dem auch hier verwendeten CD1 *nu/nu* Maus-Xenograftmodell die Beteiligung eines anderen TLRs, TLR5, und des TLR-Adaptorprotein MyD88, an Tumorentstehung und -progression nachgewiesen werden [145]. Dazu wurde in der humanen Colonkarzinomzelllinie DLD-1 TLR5 bzw. MyD88 ausgeknockt. Die TLR5- bzw. MyD88-defizienten DLD-1-Zellen wurden dann in CD1 *nu/nu* Mäuse implantiert und das Tumorstadium beobachtet. Sowohl die Defizienz von TLR5 als auch von MyD88 führte zu der Bildung von signifikant größeren Tumoren. Dabei konnte eine verminderte Produktion von Chemokinen ("*Epithelial cell-derived neutrophil-activation peptide-78*", "*macrophage-inflammatory protein α* " und Interleukin-8) und eine deutlich geringere Infiltration von Neutrophilen in die Tumoren von TLR5- und MyD88-defizienten Zellen festgestellt werden. Wurden hingegen DLD-1-Zellen mit funktionellem TLR5 implantiert und der Rezeptor durch Injektion seines spezifischen Liganden Flagellin stimuliert, so war das Tumorstadium deutlich vermindert [145]. Mit dieser Studie konnte also für einen anderen TLR ein tumormodulierender Effekt nachgewiesen werden. Inwieweit CED-assoziierte TLR5-Polymorphismen [66] diesen Effekt blockieren, müssen zukünftige Studien jedoch noch untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit führte die Überexpression des Wildtyp-TLR4- und des TLR4-T399I-Plasmids im Gegensatz dazu zu keinem Tumorstadiumphänotyp in der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2. Des Weiteren führte die Implantation des TLR4-FL- und des TLR4-T399I-Klons nicht zum Tumorstadium im Xenograftmodell (Abb.3.38.). Morphologisch war der TLR4-FL-Klon allerdings mit kleineren Zellen

deutlich geordneter als der TLR4-T399I- oder der TLR4-D299G-Klon und schien schneller auszudifferenzieren (Abb.3.17.). Bestätigt wird diese morphologische Beobachtung durch die im Vergleich zu den beiden anderen TLR4-Klonen höhere SI-mRNA-Expression (Abb.3.23.). Der TLR4-T399I-Klon war morphologisch und in seiner Proliferation und metabolischen Aktivität vergleichbar mit untransfizierten Caco-2-Zellen (Abb.3.17., Abb.3.18. und Abb.3.19.). Die schnellere Differenzierung des TLR4-FL-Klons könnte auch die signifikant geringere Proliferation (Abb.3.18.) und metabolische Aktivität der Zellen (Abb.3.19.) im Vergleich zu den beiden anderen TLR4-Klonen erklären. Die Überexpression des Wildtyp-TLR4-Plasmids könnte somit in der intestinalen, immortalisierten Epithelzelllinie Caco-2 zu einer Abmilderung des Tumoranteils der Zelllinie führen. Im Gegensatz dazu erschien der TLR4-D299G-Klon im Phänotyp und in der sehr niedrigen SI-Expression entdifferenziert, welches eine weitere typische Tumoreigenschaft ist. Weitere Untersuchungen müssen das Differenzierungsverhalten des TLR4-FL-Klons im Detail weiter analysieren.

In bisherigen Studien wurden TLR4 verschiedene, auch widersprüchliche Funktionen in diversen Tumormodellen zugeordnet. Dabei scheinen die Funktionen vom jeweils verwendeten Modell und den unterschiedlichen untersuchten Zelltypen abzuhängen. Zum Einen konnten für TLR4 schützende Effekte gegen eine Tumorentstehung und -progression gezeigt werden. In einem durch BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) chemisch-induzierten Lungenentzündungsmodell zeigte ein funktioneller TLR4 durch die Inhibierung verschiedener Signalwege, unter anderem EGFR (*"Epidermal Growth Factor Receptor"*), Entzündungsgene wie Cxcl5, Chemotaxis- und Proliferationsgene, eine Unterdrückung der Tumorentstehung [15]. Des Weiteren entwickelten in einem chemisch-induzierten Mausmodell für Hauttumore über DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracen) TLR4-defiziente Mäuse mehr Tumore als Mäuse mit einem funktionellem TLR4 [195]. Dabei entwickelten sowohl TLR4-defiziente Mäuse als auch TLR4-exprimierende Mäuse T-Zell-vermittelte Immunantworten, die sich jedoch deutlich voneinander unterschieden. Die Immunantwort der TLR4-exprimierenden Mäuse wurde dabei vor allem über IFN- γ vermittelt, die der TLR4-defizienten Mäuse hauptsächlich über IL-17. Dies ist stimmig mit einer zuvor erwähnten Studie, in der gezeigt werden konnte, dass Darmtumore durch kommensale Bakterien über eine verstärkte T_H17-Antwort getriggert wurden [187].

Im Gegensatz dazu wurde in anderen Tumormodellen ein positiver Einfluss von TLR4 auf die Tumorentstehung und -progression beschrieben. In einem *Apc^{Min}*-Modell konnte gezeigt werden, dass die Mikroflora über die MyD88-Signalkaskade in IEC die Tumorentstehung fördert [101]. Dies wurde über die Stabilisierung des Onkoproteins cMyc vermittelt. Dazu muss hier allerdings erwähnt werden, dass im *Apc^{Min}*-Modell die Tumorentstehung generell im Dünndarm untersucht wird. Dort ist die Zusammensetzung der kommensalen Mikroflora und die Bakterienmenge eine gänzlich andere als im Colon. In zwei weiteren Studien wurde von Fukata et. al. in dem chemisch-induzierten AOM/DSS-Mausmodell für die Entstehung einer Colitis-assoziierten Dysplasie ein tumorfördernder Effekt von TLR4 gezeigt [61, 62]. TLR4-exprimierende Mäuse entwickelten nach AOM/DSS-Behandlung mehr Tumore als TLR4-defiziente Mäuse. Mechanistisch konnte hierbei eine verstärkte COX-2-Expression über TLR4 durch Aktivierung von COX-2-exprimierenden Makrophagen gezeigt werden. Dies führte zu einer erhöhten Bildung von PGE₂ und einer aktivierten EGFR-Signalkaskade. Dabei war von derselben Arbeitsgruppe zuvor gezeigt worden, dass die Aktivierung von TLR4 und damit von COX-2 und PGE₂ im DSS-Colitismodell im Epithel die Wundheilung fördert und antiapoptotisch wirkt [60]. Dies lässt darauf schließen, dass die antiapoptotische Wirkung von TLR4 kurzfristig durchaus positiv für die Wundheilung im intestinalen Epithel wirkt. Eine langfristige Aktivierung in der Mukosa des Colons hingegen scheint die Tumorentstehung, zumindest in dem AOM/DSS-Modell, zu fördern.

Im humanen gesunden Gewebe ist TLR4 nur in geringen Mengen in intestinalen Epithelzellen und mononukleären Zellen der Lamina Propria exprimiert [5, 21, 74, 127, 129, 159]. Ein basaler Aktivierungszustand des Rezeptors ist für die Proliferation der IEC und die Wundheilung im DSS-Colitismodell wichtig [59, 141]. Nach der DSS-Colitisinduktion zeigten TLR4- oder MyD88-defiziente Mäuse eine verzögerte und verminderte Wundheilung [59, 141]. Wurden Wildtyp-Mäuse antibiotisch vorbehandelt und dann eine DSS-Colitis induziert, so konnte durch zusätzliche prophylaktische Gabe von LPS die Entzündung abgemildert werden [141]. In diesem Modell konnte ein aktiver TLR4 vor der chemisch-induzierten Colitis schützen. Dies wird unterstützt von anderen *In-vitro*-Studien. Wurde Wildtyp-Mäusen während einer DSS-Colitis ein TLR4-blockierender Antikörper systemisch appliziert, so wurde die Wiederherstellung der Gewebeintegrität verhindert. Die Ausbreitung der

akuten Entzündungsantworten wurde aber in der Lamina Propria zelltypabhängig inhibiert [174].

Diese Studien mit ihren widersprüchlichen Ergebnissen legen die Vermutung nahe, dass TLR4 in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Aufgaben und Funktionen haben kann. TLR4 ist nicht nur auf Tumorzellen exprimiert, sondern auch auf Zellen, die den Tumor unmittelbar umgeben. In dendritischen Zellen führt TLR4 z.B. zu einer optimalen Präsentation der Tumorantigene und kann so spezifische Immunantworten gegen den Tumor initiieren [10]. So könnte TLR4 sekundär auf die umgebenden Zellen wirken und die Karzinogenese modulieren.

Ein wichtiger Unterschied dieser Studien im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit ist die bisherige Verwendung von TLR4-defizienten Tieren. Im Gegensatz zu dem vollständigen Verlust der TLR4-Funktion in den hier beschriebenen Modellen stellte sich die TLR4-D299G-Mutation in dieser Arbeit als eine "*gain-of-function*" Mutation heraus, die nicht zum Verlust der Rezeptorfunktion führt, sondern vielmehr diese konstitutiv verändert.

Die unterschiedlichen Funktionen von TLR4 und das Fehlen möglicher sekundärer Effekte von umgebenden, anderen Zelltypen könnten erklären, warum in diesem Transfektionsmodell der Wildtyp-TLR4 weder *in vitro* noch *in vivo* invasiv und tumorprogressiv wirkt. In dieser Arbeit wurde eine intestinale Epithelzelllinie isoliert untersucht, so dass umgebende Zellen, die eventuell die Tumorentstehung triggern könnten, in diesem Modell fehlen. Außerdem wurde hier auch die Beteiligung von Bakterien nicht untersucht, die wie zuvor erwähnt, *in vivo* die Entstehung eines Colonkarzinoms triggern können [101]. In Colonkarzinom-Patienten könnte die kommensale Mikroflora im Vergleich zu gesunden Individuen anders zusammengesetzt sein [175]. Dies wird zur Zeit in weltweiten, multizentrischen Studien, dem sog "*Microbiome Projekt*", untersucht.

Des Weiteren repräsentieren die bisherigen, hier zitierten Studien vor allem chemisch-induzierte Verletzungsmodelle und können ebenfalls nur mit Einschränkungen auf den Prozess der malignen Entartung und Tumorentstehung im Menschen übertragen werden. Ein ideales Colonkarzinommodell in der Maus fehlt derzeit.

In den bisherigen Studien des Apc^{Min}-Modells und des AOM/DSS-Modells führte die Aktivierung von TLR4 zu einer erhöhten Stabilität des Onkoproteins cMyc [101] oder zu einer gesteigerten COX-2-Expression [60, 61]. Beide Mechanismen konnten in der vorliegenden Transfektionsstudie im intestinalen Epithel nicht nachvollzogen werden. Sowohl die cMyc-mRNA (Abb.3.32.) als auch die cMyc-Proteinexpression (Abb.3.33.) waren im TLR4-FL-Klon jeweils niedriger als in den beiden untersuchten TLR4-T399I- und TLR4-D299G-Klonen, aber höher als in untransfizierten Caco-2-Zellen. Für die Expression von COX-2-mRNA (Abb.3.30.) und COX-2-Protein (Abb.3.31.) zeigte sich ein ähnliches Bild. Der TLR4-FL-Klon exprimierte im Vergleich zum TLR4-T399I- und TLR4-D299G-Klon signifikant weniger mRNA und war vergleichbar mit untransfizierten Caco-2-Zellen. In der COX-2-Proteinexpression demonstrierten TLR4-FL-überexprimierende IEC deutlich weniger COX-2-Protein als untransfizierte Caco-2-Zellen, der TLR4-T399I- und der TLR4-D299G-Klon.

Stattdessen konnte in der vorliegenden Arbeit nur für den TLR4-D299G-Klon, nicht aber für den TLR4-FL-Klon, den TLR4-T399I-Klon oder für untransfizierte Caco-2-Zellen, *in vitro* invasives Wachstum (Abb.3.36.) und *in vivo* im Xenograftmodell Tumorentstehung (Abb.3.38.) gezeigt werden. Für die Invasivität konnte hierbei eine Beteiligung des STAT3-Signalweges nachgewiesen werden. STAT3 war im TLR4-D299G-Klon konstitutiv phosphoryliert und aktiviert (Abb.3.37.). Als pleiotroper Transkriptionsfaktor reguliert STAT3 viele verschiedene Gene und Signalwege, unter anderem Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Wundheilungsprozesse [162, 196]. In IEC ist STAT3 nach Aktivierung für die Proliferation und das Überleben der Zellen durch IL-6 wichtig [68]. So wird die mukosale Restitution von mucusproduzierenden Becherzellen über IL-22 und STAT3 reguliert [163] und eine IEC-spezifische Deletion von STAT3 führte zu einer erhöhten Sukzeptibilität für eine akute DSS-Colitis [133].

STAT3 ist in den meisten Tumorzellen konstitutiv aktiviert, was auch in der vorliegenden Arbeit ausschließlich im TLR4-D299G-Klon, nicht aber in untransfizierten Caco-2-Zellen oder dem TLR4-FL und dem TLR4-T399I-Klon beobachtet wurde. Das STAT3-Gen ist ein identifizierter Risikofaktor für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa [8, 14, 58, 152]. STAT3 reguliert u.a. Gene der Invasion und Angiogenese [6]. Vor Kurzem konnte eine Beteiligung von STAT3 über IL-6 an der Entstehung des Colitis-assoziierten Colonkarzinoms nachgewiesen werden [68]. In dieser Transfektionsstudie konnte allerdings keine erhöhte IL-6-Produktion in den

Klonen oder untransfizierten Caco-2-Zellen nachvollzogen werden (DNA-Mikroarray-Daten nicht gezeigt). Im Colonkarzinom ist STAT3 mit Tumorprogression und einer schlechten Prognose assoziiert worden [96, 191].

Die konstitutive Aktivierung von STAT3 über eine deutlich erhöhte Phosphorylierung an Tyrosin 705 konnte in dieser Arbeit im TLR4-D299G-Klon nachgewiesen werden (Abb.3.35.) und zeigt einen möglichen beteiligten Mechanismus für die maligne Transformation dieses Klons.

Überträgt man die Daten der vorliegenden Arbeit auf CED-Patienten, so könnten Patienten mit dem TLR4-D299G-Polymorphismus ein erhöhtes Risiko haben, ein Colitis-assoziiertes Colonkarzinom zu entwickeln. Dementsprechend müssten solche Patienten in kürzeren Abständen überwacht und eventuell früher und aggressiver therapiert werden. Zusätzlich könnte nach der Entwicklung eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms der Tumor aggressiver und schneller fortschreiten und metastasieren, so dass die Prognose der Patienten mit der TLR4-D299G-Mutation deutlich schlechter wäre. Ob dies tatsächlich in Patienten mit der TLR4-D299G-Mutation der Fall ist, wird von unserer Arbeitsgruppe zur Zeit in einer Studie von sporadischen Colonkarzinom-Patienten und CED-Patienten mit Colonkarzinom geklärt.

Bei der Entwicklung einer Colitis-assoziierten Dysplasie oder anderen Tumoren im Gastrointestinaltrakt sind wahrscheinlich aber noch viele andere genetische Faktoren und Umweltfaktoren beteiligt, die hier in dieser Transfektionsstudie nicht beleuchtet werden konnten. Hier wurde ausschließlich der Effekt der TLR4-D299G- und TLR4-T399I-Mutationen in der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 auf phänotypischer und molekularer Ebene *in vitro* und *in vivo* analysiert. Es kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass in einer anderen intestinalen Zelllinie beide Polymorphismen andere Auswirkungen haben könnten.

Neben einem erhöhten Risiko für CED wurde der TLR4-D299G-Polymorphismus mit Asthma [183], Sepsis und Infektionen mit gram-negativen Bakterien assoziiert [107]. In Bezug auf die Sepsis-Assoziation gibt es widersprüchliche Studien. So wurde in einer Studie mit einem kaukasischen Kollektiv kein Effekt des TLR4-D299G-Polymorphismus auf den Sepsisverlauf gezeigt [53]. In einem Mausmodell hatte die

Mutation ebenfalls keinen Einfluss auf die Entwicklung einer Sepsis [53]. Dies impliziert auch für TLR4-Polymorphismen eine deutliche Studien- und Populationsabhängigkeit.

Die Populationen sind dabei geographisch abgrenzbar und unterscheiden sich im vorliegenden Zustand der Polymorphismen [52]. In der weißen, europäisch-kaukasischen Bevölkerung treten die TLR4-D299G- und TLR4-T399I-Polymorphismen in 98% der Träger kosegregiert auf. In Afrika hingegen sind die Genvarianten kaum kosegregiert, und in Asien tritt weder der TLR4-D299G-, noch der TLR4-T399I-Polymorphismus auf [52].

Der TLR4-T399I-Klon zeigte in dieser Arbeit keinen Unterschied im Phänotyp zu untransfizierten Caco-2-Zellen und kein invasives Tumorpotential. In der DNA-Microarray-Analyse jedoch, die nicht Bestandteil dieser Arbeit ist, und in einigen der hier gezeigten quantitativen RT-PCRs waren auch in dieser Mutante einige Gene im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen und dem TLR4-FL-Klon fehlreguliert. Diese Fehlregulationen könnten bei einer Kosegregation ihrerseits die Auswirkungen der TLR4-D299G-Mutation in den Zellen verstärken oder auch abschwächen. In einer *In-vitro*-Transfektionsstudie ist es technisch allerdings sehr schwierig, beide Polymorphismen mit der gleichen Transfektionseffektivität in eine Zelle bzw. in allen Zellen vergleichbar stabil zu integrieren.

Dementsprechend wäre es weiterführend interessant, die kosegregierten TLR4-D299G- und TLR4-T399I-Mutationen *in vivo* im Patientenkollektiv oder im Mausmodell zu untersuchen.

Auch die Struktur von TLR4 und die Bindungsaffinität von Liganden und Korezeptoren werden mit den kosegregierten Polymorphismen anders beschrieben als mit nur einer der beiden Mutationen. Dabei ist die exakte Kristallstruktur der beiden mutierten Rezeptoren noch unbekannt. Beide Polymorphismen sind im vierten Exon des TLR4-Gens kodiert und liegen in der extrazellulären Domäne des Rezeptors [143]. Es wird vermutet, dass die TLR4-D299G-Mutation in der extrazellulären Domäne nahe der Bindungsstelle des Korezeptors MD-2 lokalisiert ist und zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führt. An der Aminosäureposition 299 könnte durch den Austausch von Asparaginsäure in Glycin eine negative Ladung wegfallen [143]. Zusätzlich könnten gebundene Liganden im Falle der TLR4-D299G-Mutation freier rotieren, da die Bindungsaffinität niedriger

vermutet wird. Auch die TLR4-T399I-Mutation könnte die Ligand- oder Kofaktorbindung behindern [143]. Im Falle der kosegregierten TLR4-D299G- und TLR4-T399I-Mutationen wird vermutet, dass die sattelähnliche Struktur der extrazellulären Domäne des Rezeptors gestört ist. Dies könnte in einer geringeren Bindungsaffinität für Liganden, Korezeptoren oder beide resultieren [143].

Für eine erfolgreiche Signaltransduktion benötigt TLR4 drei weitere Korezeptoren, CD14, LBP und MD-2. In gesunder intestinaler Mukosa ist die Expression dieser Korezeptoren eher niedrig [5, 27, 119, 160]. In verschiedenen Zelltypen wird die Expression der Korezeptoren sowohl in nichtaktiver als auch aktiver humaner CED-Colitis signifikant hochreguliert [27, 74, 82, 119, 178]. Diese essentielle Beteiligung verschiedener Korezeptoren legt die Hypothese nahe, dass auch andere Zelltypen und Genvarianten in anderen Molekülen die Signaltransduktion von TLR4 entscheidend beeinflussen können. Dementsprechend wäre es in Zukunft von Bedeutung, auch diese weiter zu untersuchen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte somit für die CED-assoziierte TLR4-D299G-Mutation im intestinalen Epithel ein maligner Tumorzellphänotyp mit dem Potential zum invasiven Wachstum *in vitro* und zur Tumorentstehung *in vivo* im Xenograftmodell nachgewiesen werden. Dabei wurde die TLR4-D299G-Mutation als eine "*gain-of-function*"-Mutation charakterisiert. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von pUNO-TLR4-FL und pUNO-TLR4-T399I nicht zu derartigen morphologischen und funktionellen Veränderungen im Vergleich zu untransfizierten Caco-2-Zellen.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit erstmals zelluläre Auswirkungen der Colitis ulcerosa-assoziierten TLR2-R753Q- und der CED-assoziierten TLR4-D299G-Mutation im intestinalen Epithel gezeigt werden. Dabei wurde hier als Modell die intestinale Epithelzelllinie Caco-2 gewählt, so dass weiterführende Studien die hier untersuchten Polymorphismen in anderen Epithelzelllinien analysieren sollten. Die Übertragbarkeit dieser Daten muss in Folgestudien sowohl in Mausmodellen, in denen die humanen Polymorphismen gezielt im intestinalen Epithel oder ubiquitär überexprimiert werden, als auch im Patienten weiter untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden für den TLR2-R753Q-Polymorphismus gestörte Wundheilungsmechanismen identifiziert, die den schweren Krankheitsphänotyp der Pancolitis in Colitis ulcerosa-Patienten erklären könnten. Ebenfalls bieten die Daten der vorliegenden Arbeit Hinweise für einen möglichen therapeutischen Einsatz von rekombinanten TFF3 und des TLR2-Liganden PCSK in Colitis ulcerosa-Patienten.

Des Weiteren führte die Überexpression der TLR4-D299G-Mutation in der intestinalen Epithelzelllinie in der vorliegenden Arbeit zur malignen Entartung. Übertragen auf CED-Patienten mit der Mutation könnten diese ein größeres Risiko besitzen, ein Colitis-assoziiertes Colonkarzinom zu entwickeln und müssten dementsprechend intensiver in der Prävention betreut und aggressiver therapiert werden.

Allgemein betrachtet legen die Daten dieser Arbeit nahe, dass TLR-Polymorphismen in CED- und in Colitis ulcerosa-Patienten verschiedene Patientensubphänotypen induzieren können. In Zukunft wäre es daher sinnvoll, diese Subphänotypen ihrem jeweiligen Genotyp zuzuordnen und individualisierte, angepasste Therapien zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Die Ätio-Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) ist bislang noch nicht eindeutig geklärt, wobei Toll-like Rezeptoren (TLRs) eine Schlüsselrolle in der mukosalen Immunität spielen. So wurde der TLR2-R753Q-Polymorphismus mit einem schweren Krankheitsphänotyp der Colitis ulcerosa, der sog. Pancolitis, und die TLR4-Polymorphismen TLR4-D299G und TLR4-T399I als Risikofaktoren mit CED assoziiert. Dementsprechend sollten in der vorliegenden Arbeit die funktionellen und phänotypischen Auswirkungen dieser TLR2/4-Genmutationen im intestinalen Epithel untersucht werden.

TLR2 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der intestinalen Barriereintegrität und der mukosalen Homöostase. In dieser Transfektionsstudie wirkte sich die Überexpression von TLR2 in intestinalen Epithelzellen (IEC) positiv auf die Differenzierung der Caco-2-Zellen aus. Zusätzlich schützte dies die Barriereintegrität der IEC, unter anderem auch durch Induktion der Proliferation und metabolischen Aktivität. In dieser Studie förderte die Überexpression von TLR2 *in vitro* verschiedene Wundheilungsmechanismen, z.B. durch eine erhöhte Zell-Zell-Kommunikation und eine effektivere und schnellere Migration und Restitution nach Verwundung, vor allem durch die konstitutive Produktion und Sekretion von TFF3.

Im Gegensatz dazu zeigte sich die TLR2-R753Q-Mutation in dieser Arbeit als eine "loss-of-function" Mutation mit schweren Wundheilungsstörungen in IEC. Im Einzelnen waren dies Defizite in der Zell-Zell-Kommunikation – wahrscheinlich aufgrund eines übermäßigen Abbaus des Cx43-Proteins durch ein hyperaktives Proteasom. Des Weiteren waren Proliferation und metabolische Aktivität der TLR2-R753Q-IEC signifikant vermindert und die Zellen zeigten keine ausreichende Restitution nach Verwundung. Dies ist am ehesten durch den TFF3-Mangel in den TLR2-R753Q-Zellen bedingt.

Die hier erstmals identifizierten Wundheilungsstörungen in den TLR2-R753Q-IEC könnten den schwereren Krankheitsphänotyp der Pancolitis in Colitis ulcerosa-Patienten erklären. Diese ersten Hinweise auf mögliche Mechanismen einer Pancolitis und weiterführende Studien in der Zukunft könnten neue Therapieansätze für Colitis ulcerosa-Patienten durch Subgruppierung der Patienten analog des Genotyps TLR2-R753Q ergeben.

In zweiten Teil der Arbeit wurde der TLR4-D299G-Polymorphismus hingegen als eine "*gain-of-function*" Mutation in IEC identifiziert. Die Überexpression der TLR4-D299G-Mutation führte zu einem Tumorzellphänotyp mit gestörtem Aufbau des Aktinzytoskeletts und schweren Störungen des Zellteilungsablaufes. Zusätzlich waren die TLR4-D299G-Zellen durch ihre niedrige SI-Expression entdifferenziert, welches eine weitere typische Tumoreigenschaft ist.

Im TLR4-D299G-Klon waren wesentliche Gene von Entzündungsmediatoren, Gerinnungsfaktoren und der Komplementkaskade konstitutiv erhöht, so dass die TLR4-D299G-Mutation in IEC den Status einer andauernden Entzündung auszulösen scheint. Der TLR4-D299G-Klon zeigte in funktionellen Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im CD1 *nu/nu* Xenograft-Mausmodell einen invasiven Tumorzellphänotyp. Als ein möglicher beteiligter Mechanismus für die maligne Transformation des TLR4-D299G-Klons konnte *in vitro* der STAT3-Signalweg identifiziert werden. STAT3 war im TLR4-D299G-Klon durch eine deutlich erhöhte Phosphorylierung an Tyrosin 705 konstitutiv aktiviert. Die Inhibition von STAT3 führte zur Blockade der Tumorzellinvasion.

Die Überexpression von TLR4-FL und TLR4-T399I in IEC führte hingegen zu keiner der oben beschriebenen Eigenschaften des TLR4-D299G-Klons.

Langanhaltende Entzündungen können zur Tumorentstehung führen und CED-Patienten haben so ein erhöhtes Risiko, ein Colitis-assoziiertes Colonkarzinom zu entwickeln. Überträgt man die Daten der vorliegenden Arbeit auf CED-Patienten, so könnten Patienten mit dem TLR4-D299G-Polymorphismus ein erhöhtes Risiko haben, ein Colitis-assoziiertes Colonkarzinom mit besonders aggressivem Wachstumsverhalten zu entwickeln. Dementsprechend müssten solche Patienten in kürzeren Abständen überwacht und eventuell früher und intensiver therapiert werden.

6. Anhang

6.1. Vektorkarte pUNO-TLR2-FL und Sequenzausschnitt der Mutation TLR2-R753Q

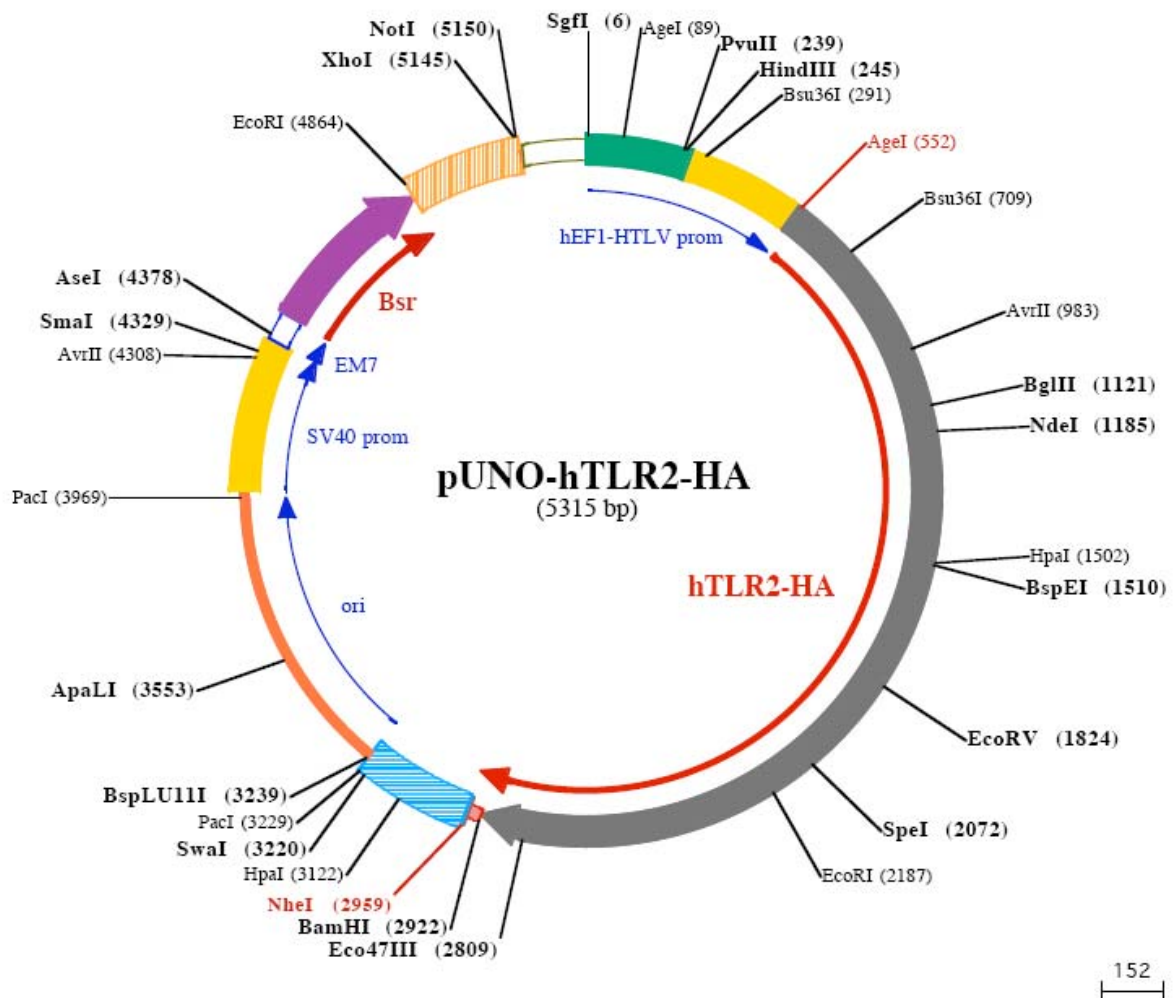


Abb.6.1. Vektorkarte pUNO-TLR2-FL der Firma InvivoGen. Die Abbildung zeigt die Vektorkarte des käuflich erworbenen pUNO-TLR2-FL-Plasmids mit den Schnittstellen der Restriktionsenzyme. Die Schnittstellen der Enzyme AgeI und NheI zur Überprüfung des Inserts sind rot markiert.

Aminosäuresequenzausschnitt der pUNO-TLR2-R753Q-Mutation:

2470 KLQKIMNTKTYLEWPMDEAQREGFWVNLRA 2559

zugehörige Nukleotidsequenz:

AAGCTG**CAG**AAGATAATGAACACCAAGACCTACCTGGAGTGGCCCATGGACGAGGCTCAGCG
GGAAGGATTTTGGGTAAATCTGAGAGCT

6.2. Vektorkarte pUNO-TLR4-FL und Sequenzausschnitte der beiden Mutationen TLR4-T399I und TLR4-D299G

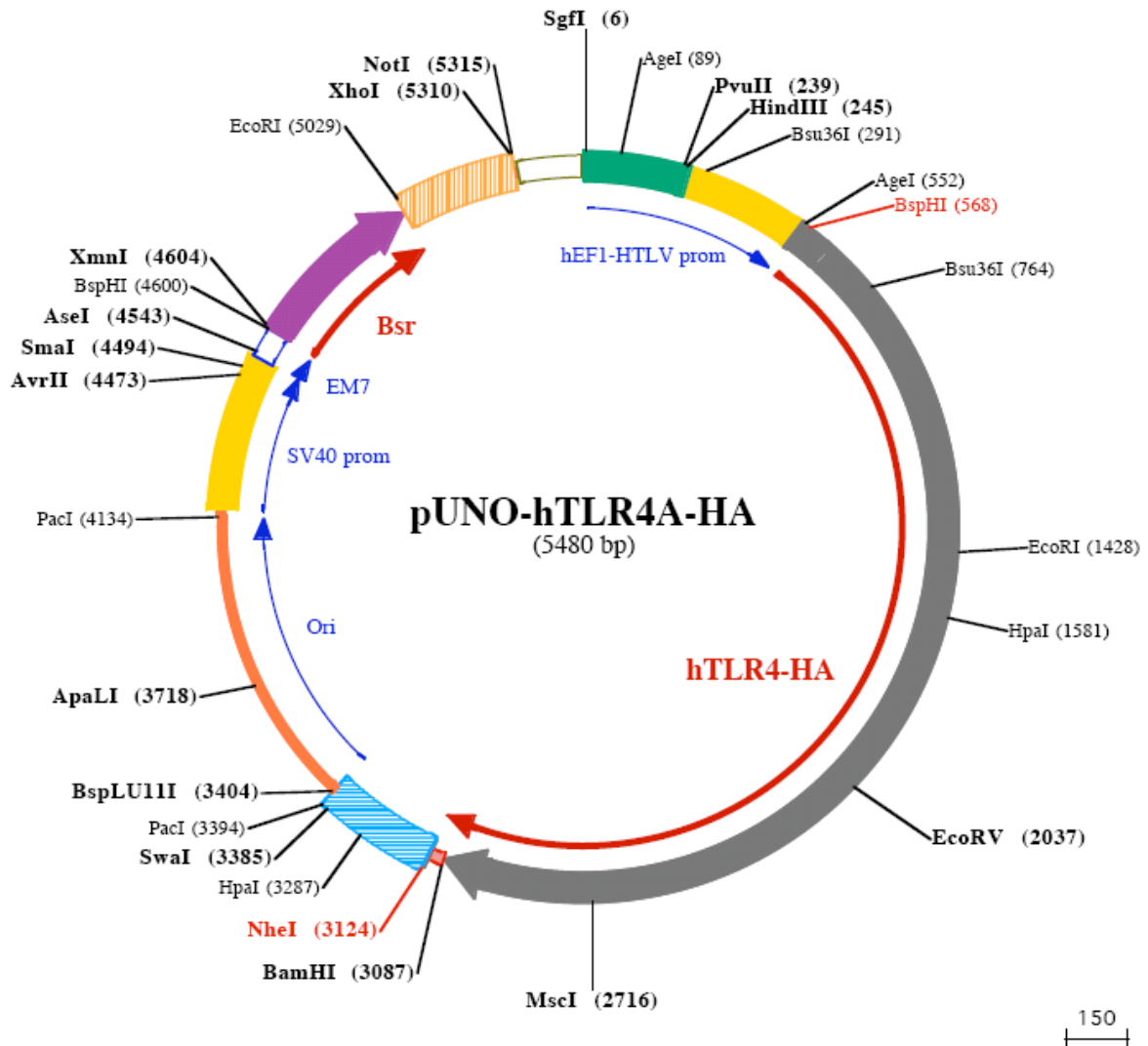


Abb.6.2. Vektorkarte pUNO-TLR4-FL der Firma InvivoGen. Die Abbildung zeigt die Vektorkarte des käuflich erworbenen pUNO-TLR4-FL-Plasmids mit den Schnittstellen der Restriktionsenzyme. Die Schnittstellen der Enzyme BspHI und NheI zur Überprüfung des Inserts sind rot markiert.

Aminosäuresequenzausschnitt der pUNO-TLR4-T399I-Mutation:

1333 TISLKYLDLSFNGVITMSSNFLGLEQLEHLDFQ 1431

zugehörige Nukleotidsequenz

ACAATCAGCCTAAAGTATTTAGATCTGAGCTTCAATGGTGTATTACCATGAGTTCAAACCTT
CTTGGGCTTAGAACAACACTAGAACATCTGGATTTCAG

Aminosäuresequenzausschnitt der pUNO-TLR4-D299G-Mutation:

1033 D**G**IIDLNFNCLTNVSSFSLVSVTIERVKDFSYNF 1131

zugehörige Nukleotidsequenz

GAT**G****G****T**ATTATTGACTTATTTAATTGTTTGACAAATGTTTCTTCATTTTCCCTGGTGAGTGT
GACTATTGAAAGGGTAAAAGACTTTTCTTATAATTC

7. Literaturverzeichnis

1. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-37&Template=cellBiology>.
2. http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml.
3. **Abraham, C., und J. H. Cho.** 2009. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **361**:2066-78.
4. **Abreu, M. T., P. Vora, E. Faure, L. S. Thomas, E. T. Arnold, und M. Arditi.** 2001. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **167**:1609-16.
5. **Abreu, M. T., E. T. Arnold, L. S. Thomas, R. Gonsky, Y. Zhou, B. Hu, et al.** 2002. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **277**:20431-7.
6. **Aggarwal, B. B., A. B. Kunnumakkara, K. B. Harikumar, S. R. Gupta, S. T. Tharakan, C. Koca, et al.** 2009. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci* **1171**:59-76.
7. **Albini, A., Y. Iwamoto, H. K. Kleinman, G. R. Martin, S. A. Aaronson, J. M. Kozlowski, et al.** 1987. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* **47**:3239-45.
8. **Anderson, C. A., D. C. Massey, J. C. Barrett, N. J. Prescott, M. Tremelling, S. A. Fisher, et al.** 2009. Investigation of Crohn's disease risk loci in ulcerative colitis further defines their molecular relationship. *Gastroenterology* **136**:523-9 e3.
9. **Anderson, K. V., L. Bokla, und C. Nusslein-Volhard.** 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**:791-8.
10. **Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, et al.** 2007. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* **13**:1050-9.
11. **Arbour, N. C., E. Lorenz, B. C. Schutte, J. Zabner, J. N. Kline, M. Jones, et al.** 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* **25**:187-91.
12. **Artursson, P., K. Palm, und K. Luthman.** 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* **46**:27-43.
13. **Barker, N., und H. Clevers.** 2006. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **5**:997-1014.
14. **Barrett, J. C., S. Hansoul, D. L. Nicolae, J. H. Cho, R. H. Duerr, J. D. Rioux, et al.** 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* **40**:955-62.
15. **Bauer, A. K., J. Fostel, L. M. Degraff, E. A. Rondini, C. Walker, S. F. Grissom, et al.** 2009. Transcriptomic analysis of pathways regulated by toll-

- like receptor 4 in a murine model of chronic pulmonary inflammation and carcinogenesis. *Mol Cancer* **8**:107.
16. **Beck, P. L., J. F. Wong, Y. Li, S. Swaminathan, R. J. Xavier, K. L. Devaney, et al.** 2004. Chemotherapy- and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor. *Gastroenterology* **126**:796-808.
 17. **Beutler, B., und A. Poltorak.** 2001. The sole gateway to endotoxin response: how LPS was identified as Tlr4, and its role in innate immunity. *Drug Metab Dispos* **29**:474-8.
 18. **Bollrath, J., T. J. Phesse, V. A. von Burstin, T. Putoczki, M. Bennecke, T. Bateman, et al.** 2009. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* **15**:91-102.
 19. **Brown, R. A., J. H. Gralewski, und R. R. Razonable.** 2009. The R753Q polymorphism abrogates toll-like receptor 2 signaling in response to human cytomegalovirus. *Clin Infect Dis* **49**:e96-9.
 20. **Browning, B. L., C. Huebner, I. Petermann, R. B. Gearry, M. L. Barclay, A. N. Shelling, et al.** 2007. Has toll-like receptor 4 been prematurely dismissed as an inflammatory bowel disease gene? Association study combined with meta-analysis shows strong evidence for association. *Am J Gastroenterol* **102**:2504-12.
 21. **Cario, E., und D. K. Podolsky.** 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* **68**:7010-7.
 22. **Cario, E., I. M. Rosenberg, S. L. Brandwein, P. L. Beck, H. C. Reinecker, und D. K. Podolsky.** 2000. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* **164**:966-72.
 23. **Cario, E., D. Brown, M. McKee, K. Lynch-Devaney, G. Gerken, und D. K. Podolsky.** 2002. Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am J Pathol* **160**:165-73.
 24. **Cario, E., G. Gerken, und D. K. Podolsky.** 2004. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* **127**:224-38.
 25. **Cario, E.** 2005. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* **54**:1182-93.
 26. **Cario, E., und D. K. Podolsky.** 2005. Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals. *Mol Immunol* **42**:887-93.
 27. **Cario, E., D. T. Golenbock, A. Visintin, M. Runzi, G. Gerken, und D. K. Podolsky.** 2006. Trypsin-sensitive modulation of intestinal epithelial MD-2 as mechanism of lipopolysaccharide tolerance. *J Immunol* **176**:4258-66.
 28. **Cario, E., G. Gerken, und D. K. Podolsky.** 2007. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* **132**:1359-74.
 29. **Cario, E.** 2008. Innate immune signalling at intestinal mucosal surfaces: a fine line between host protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol* **24**:725-32.

30. **Cario, E.** 2008. Therapeutic impact of toll-like receptors on inflammatory bowel diseases: a multiple-edged sword. *Inflamm Bowel Dis* **14**:411-21.
31. **Cario, E.** 2010. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: A decade later. *Inflamm Bowel Dis* DOI: 10.1002/ibd.21282.
32. **Cario, E.** 2010. Heads up! How the intestinal epithelium safeguards mucosal barrier immunity through the inflammasome and beyond. *Curr Opin Gastroenterol* doi: 10.1097/MOG.0b013e32833d4b88.
33. **Carroll, K. M., T. T. Wong, D. L. Drabik, und E. B. Chang.** 1988. Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix. *Am J Physiol* **254**:G355-60.
34. **Carty, M., R. Goodbody, M. Schroder, J. Stack, P. N. Moynagh, und A. G. Bowie.** 2006. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* **7**:1074-81.
35. **Casati, J., und B. B. Toner.** 2000. Psychosocial aspects of inflammatory bowel disease. *Biomed Pharmacother* **54**:388-93.
36. **Chang, Y. J., M. S. Wu, J. T. Lin, B. S. Sheu, T. Muta, H. Inoue, et al.** 2004. Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. *Mol Pharmacol* **66**:1465-77.
37. **Cho, J. H., D. L. Nicolae, L. H. Gold, C. T. Fields, M. C. LaBuda, P. M. Rohal, et al.** 1998. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7502-7.
38. **Chong, S., S. A. Dando, und R. A. Morrison.** 1997. Evaluation of Biocoat intestinal epithelium differentiation environment (3-day cultured Caco-2 cells) as an absorption screening model with improved productivity. *Pharm Res* **14**:1835-7.
39. **Ciechanover, A.** 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**:13-21.
40. **da Silva Correia, J., und R. J. Ulevitch.** 2002. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J Biol Chem* **277**:1845-54.
41. **Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A. L. Glasser, N. Barnich, et al.** 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**:412-21.
42. **de Bruine, A. P., J. E. de Vries, W. N. Dinjens, P. T. Moerkerk, E. P. van der Linden, M. M. Pijls, et al.** 1993. Human Caco-2 cells transfected with c-Ha-Ras as a model for endocrine differentiation in the large intestine. *Differentiation* **53**:51-60.
43. **De Jager, P. L., D. Franchimont, A. Waliszewska, A. Bitton, A. Cohen, D. Langelier, et al.** 2007. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun* **8**:387-97.
44. **Dignass, A., K. Lynch-Devaney, H. Kindon, L. Thim, und D. K. Podolsky.** 1994. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest* **94**:376-83.

45. **Duerr, R. H., K. D. Taylor, S. R. Brant, J. D. Rioux, M. S. Silverberg, M. J. Daly, et al.** 2006. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**:1461-3.
46. **Durual, S., C. Blanchard, M. Estienne, M. F. Jacquier, J. C. Cuber, V. Perrot, et al.** 2005. Expression of human TFF3 in relation to growth of HT-29 cell subpopulations: involvement of PI3-K but not STAT6. *Differentiation* **73**:36-44.
47. **el-Fouly, M. H., J. E. Trosko, und C. C. Chang.** 1987. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp Cell Res* **168**:422-30.
48. **Elson, C. O., Y. Cong, V. J. McCracken, R. A. Dimmitt, R. G. Lorenz, und C. T. Weaver.** 2005. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* **206**:260-76.
49. **Ey, B., A. Eyking, G. Gerken, D. K. Podolsky, und E. Cario.** 2009. TLR2 mediates gap junctional intercellular communication through connexin-43 in intestinal epithelial barrier injury. *J Biol Chem* **284**:22332-43.
50. **Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, et al.** 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7413-7.
51. **Fenteany, G., R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, und S. L. Schreiber.** 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **268**:726-31.
52. **Ferwerda, B., M. B. McCall, S. Alonso, E. J. Giamarellos-Bourboulis, M. Mouktaroudi, N. Izaguirre, et al.** 2007. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:16645-50.
53. **Feterowski, C., K. Emmanuilidis, T. Miethke, K. Gerauer, M. Rump, K. Ulm, et al.** 2003. Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis. *Immunology* **109**:426-31.
54. **Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, et al.** 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**:78-83.
55. **Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, et al.** 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* **198**:1043-55.
56. **Fogh, J., J. M. Fogh, und T. Orfeo.** 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **59**:221-6.
57. **Franchimont, D., S. Vermeire, H. El Housni, M. Pierik, K. Van Steen, T. Gustot, et al.** 2004. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **53**:987-92.
58. **Franke, A., T. Balschun, C. Sina, D. Ellinghaus, R. Hasler, G. Mayr, et al.** Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL). *Nat Genet* **42**:292-4.

59. **Fukata, M., K. S. Michelsen, R. Eri, L. S. Thomas, B. Hu, K. Lukasek, et al.** 2005. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**:G1055-65.
60. **Fukata, M., A. Chen, A. Klepper, S. Krishnareddy, A. S. Vamadevan, L. S. Thomas, et al.** 2006. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* **131**:862-77.
61. **Fukata, M., A. Chen, A. S. Vamadevan, J. Cohen, K. Breglio, S. Krishnareddy, et al.** 2007. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology* **133**:1869-81.
62. **Fukata, M., Y. Hernandez, D. Conduah, J. Cohen, A. Chen, K. Breglio, et al.** 2009. Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflamm Bowel Dis* **15**:997-1006.
63. **Furuta, G. T., J. R. Turner, C. T. Taylor, R. M. Hershberg, K. Comerford, S. Narravula, et al.** 2001. Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J Exp Med* **193**:1027-34.
64. **Garlanda, C., F. Riva, T. Veliz, N. Polentarutti, F. Pasqualini, E. Radaelli, et al.** 2007. Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family. *Cancer Res* **67**:6017-21.
65. **Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski, und J. L. Madara.** 2001. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* **167**:1882-5.
66. **Gewirtz, A. T., M. Vijay-Kumar, S. R. Brant, R. H. Duerr, D. L. Nicolae, und J. H. Cho.** 2006. Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**:G1157-63.
67. **Gill, S. R., M. Pop, R. T. Deboy, P. B. Eckburg, P. J. Turnbaugh, B. S. Samuel, et al.** 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312**:1355-9.
68. **Grivennikov, S., E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G. Y. Yu, S. Vallabhapurapu, et al.** 2009. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* **15**:103-13.
69. **Guruswamy, S., M. V. Swamy, C. I. Choi, V. E. Steele, und C. V. Rao.** 2008. S-adenosyl L-methionine inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in F344 rats and suppresses human colon cancer Caco-2 cell growth in 3D culture. *Int J Cancer* **122**:25-30.
70. **Gustafsson, A. C., I. Kupersmidt, E. Edlundh-Rose, G. Greco, A. Serafino, E. K. Krasnowska, et al.** 2005. Global gene expression analysis in time series following N-acetyl L-cysteine induced epithelial differentiation of human normal and cancer cells in vitro. *BMC Cancer* **5**:75.
71. **Habu, S., H. Fukui, K. Shimamura, M. Kasai, Y. Nagai, K. Okumura, et al.** 1981. In vivo effects of anti-asialo GM1. I. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J Immunol* **127**:34-8.

-
72. **Hampe, J., A. Franke, P. Rosenstiel, A. Till, M. Teuber, K. Huse, et al.** 2007. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* **39**:207-11.
 73. **Hauri, H. P., E. E. Sterchi, D. Bienz, J. A. Fransen, und A. Marxer.** 1985. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* **101**:838-51.
 74. **Hausmann, M., S. Kiessling, S. Mestermann, G. Webb, T. Spottl, T. Andus, et al.** 2002. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* **122**:1987-2000.
 75. **Hershberg, R. M., D. H. Cho, A. Youakim, M. B. Bradley, J. S. Lee, P. E. Framson, et al.** 1998. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* **102**:792-803.
 76. **Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, et al.** 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**:743-8.
 77. **Hong, J., E. Leung, A. G. Fraser, T. R. Merriman, P. Vishnu, und G. W. Krissansen.** 2007. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol* **22**:1760-6.
 78. **Horng, T., G. M. Barton, und R. Medzhitov.** 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* **2**:835-41.
 79. **Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cezard, J. Belaiche, et al.** 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:599-603.
 80. **Itzkowitz, S. H., und N. Harpaz.** 2004. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **126**:1634-48.
 81. **Itzkowitz, S. H., und X. Yio.** 2004. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**:G7-17.
 82. **Kamada, N., T. Hisamatsu, S. Okamoto, H. Chinen, T. Kobayashi, T. Sato, et al.** 2008. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest* **118**:2269-80.
 83. **Karin, M.** 2006. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**:431-6.
 84. **Karlinger, K., T. Gyorke, E. Mako, A. Mester, und Z. Tarjan.** 2000. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* **35**:154-67.
 85. **Kaser, A., A. H. Lee, A. Franke, J. N. Glickman, S. Zeissig, H. Tilg, et al.** 2008. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* **134**:743-56.
 86. **Kaser, A., und R. S. Blumberg.** 2009. Endoplasmic reticulum stress in the intestinal epithelium and inflammatory bowel disease. *Semin Immunol* **21**:156-63.
 87. **Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, und S. Akira.** 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**:115-22.
 88. **Kawai, T., und S. Akira.** 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**:816-25.

89. **Kawai, T., und S. Akira.** 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**:373-84.
90. **Kiechl, S., E. Lorenz, M. Reindl, C. J. Wiedermann, F. Oberhollenzer, E. Bonora, et al.** 2002. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* **347**:185-92.
91. **Kim, S., H. Takahashi, W. W. Lin, P. Descargues, S. Grivennikov, Y. Kim, et al.** 2009. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* **457**:102-6.
92. **Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, J. R. Hassell, V. L. Star, F. B. Cannon, G. W. Laurie, et al.** 1986. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* **25**:312-8.
93. **Kormann, M. S., R. Ferstl, M. Depner, N. Klopp, S. Spiller, T. Illig, et al.** 2009. Rare TLR2 mutations reduce TLR2 receptor function and can increase atopy risk. *Allergy* **64**:636-42.
94. **Kraus, S., und N. Arber.** 2009. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol* **9**:405-10.
95. **Kusaba, T., T. Nakayama, K. Yamazumi, Y. Yakata, A. Yoshizaki, T. Nagayasu, et al.** 2005. Expression of p-STAT3 in human colorectal adenocarcinoma and adenoma; correlation with clinicopathological factors. *J Clin Pathol* **58**:833-8.
96. **Kusaba, T., T. Nakayama, K. Yamazumi, Y. Yakata, A. Yoshizaki, K. Inoue, et al.** 2006. Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol Rep* **15**:1445-51.
97. **Laing, J. G., und E. C. Beyer.** 1995. The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* **270**:26399-403.
98. **Laird, D. W.** 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* **394**:527-43.
99. **Lakatos, P. L., und L. Lakatos.** 2008. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol* **14**:3937-47.
100. **Leaphart, C. L., F. Qureshi, S. Cetin, J. Li, T. Dubowski, C. Baty, et al.** 2007. Interferon-gamma inhibits intestinal restitution by preventing gap junction communication between enterocytes. *Gastroenterology* **132**:2395-411.
101. **Lee, S. H., L. L. Hu, J. Gonzalez-Navajas, G. S. Seo, C. Shen, J. Brick, et al.** 2010. ERK activation drives intestinal tumorigenesis in Apc(min/+) mice. *Nat Med* **16**:665-70.
102. **Leithe, E., und E. Rivedal.** 2004. Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin-43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment. *J Biol Chem* **279**:50089-96.
103. **Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, und J. A. Hoffmann.** 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**:973-83.
104. **Lin, W. W., und M. Karin.** 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* **117**:1175-83.
105. **Loftus, C. G., E. V. Loftus, Jr., W. S. Harmsen, A. R. Zinsmeister, W. J. Tremaine, L. J. Melton, 3rd, et al.** 2007. Update on the incidence and

- prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis* **13**:254-61.
106. **Lorenz, E., J. P. Mira, K. L. Cornish, N. C. Arbour, und D. A. Schwartz.** 2000. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* **68**:6398-401.
 107. **Lorenz, E., J. P. Mira, K. L. Frees, und D. A. Schwartz.** 2002. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* **162**:1028-32.
 108. **Lundberg, A., L. A. Wikberg, J. Ilonen, O. Vaarala, und M. F. Bottcher.** 2008. Lipopolysaccharide-induced immune responses in relation to the TLR4(Asp299Gly) gene polymorphism. *Clin Vaccine Immunol* **15**:1878-83.
 109. **Macdonald, T. T., und G. Monteleone.** 2005. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* **307**:1920-5.
 110. **Mahmood, A., L. Melley, A. J. Fitzgerald, S. Ghosh, und R. J. Playford.** 2005. Trial of trefoil factor 3 enemas, in combination with oral 5-aminosalicylic acid, for the treatment of mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* **21**:1357-64.
 111. **Marchiando, A. M., W. V. Graham, und J. R. Turner.** 2010. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol* **5**:119-44.
 112. **Maroux, S., E. Coudrier, H. Feracci, J. P. Gorvel, und D. Louvard.** 1988. Molecular organization of the intestinal brush border. *Biochimie* **70**:1297-306.
 113. **Mashimo, H., D. C. Wu, D. K. Podolsky, und M. C. Fishman.** 1996. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* **274**:262-5.
 114. **McConnell, B. B., und V. W. Yang.** 2009. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* **5**:69-74.
 115. **McCormack, S. A., M. J. Viar, und L. R. Johnson.** 1992. Migration of IEC-6 cells: a model for mucosal healing. *Am J Physiol* **263**:G426-35.
 116. **McGovern, D. P., A. Gardet, L. Torkvist, P. Goyette, J. Essers, K. D. Taylor, et al.** 2010. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet* **42**:332-7.
 117. **Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, und C. A. Janeway, Jr.** 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**:394-7.
 118. **Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, et al.** 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* **2**:253-8.
 119. **Meijssen, M. A., S. L. Brandwein, H. C. Reinecker, A. K. Bhan, und D. K. Podolsky.** 1998. Alteration of gene expression by intestinal epithelial cells precedes colitis in interleukin-2-deficient mice. *Am J Physiol* **274**:G472-9.
 120. **Melmed, G. Y., und S. R. Targan.** 2010. Future biologic targets for IBD: potentials and pitfalls. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**:110-7.
 121. **Merx, S., M. Neumaier, H. Wagner, C. J. Kirschning, und P. Ahmad-Nejad.** 2007. Characterization and investigation of single nucleotide polymorphisms and a novel TLR2 mutation in the human TLR2 gene. *Hum Mol Genet* **16**:1225-32.
 122. **Musil, L. S., B. A. Cunningham, G. M. Edelman, und D. A. Goodenough.** 1990. Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in

- junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol* **111**:2077-88.
123. **Nagler-Anderson, C.** 2001. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol* **1**:59-67.
 124. **NCBI.** 2010. Tight Junction Protein 1 (Zona occludens-1) NCBI GI 116875764.
 125. **Ogura, Y., D. K. Bonen, N. Inohara, D. L. Nicolae, F. F. Chen, R. Ramos, et al.** 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:603-6.
 126. **Orholm, M., P. Munkholm, E. Langholz, O. H. Nielsen, T. I. Sorensen, und V. Binder.** 1991. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **324**:84-8.
 127. **Ortega-Cava, C. F., S. Ishihara, M. A. Rumi, K. Kawashima, N. Ishimura, H. Kazumori, et al.** 2003. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* **170**:3977-85.
 128. **Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, und T. Seya.** 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* **4**:161-7.
 129. **Otte, J. M., E. Cario, und D. K. Podolsky.** 2004. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **126**:1054-70.
 130. **Palm, N. W., und R. Medzhitov.** 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* **227**:221-33.
 131. **Papadakis, K. A., J. K. Tung, S. W. Binder, L. Y. Kam, M. T. Abreu, S. R. Targan, et al.** 2001. Outcome of cytomegalovirus infections in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **96**:2137-42.
 132. **Peterson, D. E., N. P. Barker, L. I. Akhmadullina, I. Rodionova, N. Z. Sherman, I. S. Davidenko, et al.** 2009. Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study of recombinant human intestinal trefoil factor oral spray for prevention of oral mucositis in patients with colorectal cancer who are receiving fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* **27**:4333-8.
 133. **Pickert, G., C. Neufert, M. Leppkes, Y. Zheng, N. Wittkopf, M. Warntjen, et al.** 2009. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* **206**:1465-72.
 134. **Pierik, M., S. Joossens, K. Van Steen, N. Van Schuerbeek, R. Vlietinck, P. Rutgeerts, et al.** 2006. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* **12**:1-8.
 135. **Podolsky, D. K.** 1993. Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. *Am J Physiol* **264**:G179-86.
 136. **Podolsky, D. K., G. Gerken, A. Eyking, und E. Cario.** 2009. Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency. *Gastroenterology* **137**:209-20.
 137. **Potten, C. S., M. Kellett, S. A. Roberts, D. A. Rew, und G. D. Wilson.** 1992. Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut* **33**:71-8.

138. **Quaroni, A., J. Wands, R. L. Trelstad, und K. J. Isselbacher.** 1979. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* **80**:248-65.
139. **Quaroni, A., und R. J. May.** 1980. Establishment and characterization of intestinal epithelial cell cultures. *Methods Cell Biol* **21B**:403-27.
140. **Radtke, F., und H. Clevers.** 2005. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* **307**:1904-9.
141. **Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, und R. Medzhitov.** 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**:229-41.
142. **Rakoff-Nahoum, S., und R. Medzhitov.** 2007. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science* **317**:124-7.
143. **Rallabhandi, P., J. Bell, M. S. Boukhvalova, A. Medvedev, E. Lorenz, M. Arditi, et al.** 2006. Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol* **177**:322-32.
144. **Reya, T., und H. Clevers.** 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**:843-50.
145. **Rhee, S. H., E. Im, und C. Pothoulakis.** 2008. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology* **135**:518-28.
146. **Rioux, J. D., R. J. Xavier, K. D. Taylor, M. S. Silverberg, P. Goyette, A. Huett, et al.** 2007. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* **39**:596-604.
147. **Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, und J. F. Bazan.** 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:588-93.
148. **Rousset, M.** 1986. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* **68**:1035-40.
149. **Rumio, C., D. Besusso, M. Palazzo, S. Selleri, L. Sfondrini, F. Dubini, et al.** 2004. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. *Am J Pathol* **165**:373-81.
150. **Saito, K., T. Oku, N. Ata, H. Miyashiro, M. Hattori, und I. Saiki.** 1997. A modified and convenient method for assessing tumor cell invasion and migration and its application to screening for inhibitors. *Biol Pharm Bull* **20**:345-8.
151. **Sartor, R. B.** 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **134**:577-94.
152. **Sato, K., M. Shiota, S. Fukuda, E. Iwamoto, H. Machida, T. Inamine, et al.** 2009. Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population. *J Clin Immunol* **29**:815-25.
153. **Schmidt, N., E. Gonzalez, A. Visekruna, A. A. Kuhl, C. Loddenkemper, H. Mollenkopf, et al.** 2010. Targeting the proteasome: partial inhibition of the

- proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis. *Gut* **59**:896-906.
154. **Schroder, N. W., C. Hermann, L. Hamann, U. B. Gobel, T. Hartung, und R. R. Schumann.** 2003. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med* **81**:368-72.
 155. **Selsted, M. E., und A. J. Ouellette.** 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* **6**:551-7.
 156. **Shaw, A. J.** 1996. *Epithelial Cell Culture - A practical approach.* Oxford University Press.
 157. **Shen, X. Y., R. H. Shi, Y. Wang, H. J. Zhang, X. Q. Zhou, F. C. Shen, et al.** 2010. [Toll-like receptor gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory bowel disease in Chinese Han and Caucasian populations.]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **90**:1416-20.
 158. **Shkoda, A., P. A. Ruiz, H. Daniel, S. C. Kim, G. Rogler, R. B. Sartor, et al.** 2007. Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation. *Gastroenterology* **132**:190-207.
 159. **Singh, J. C., S. M. Cruickshank, D. J. Newton, L. Wakenshaw, A. Graham, J. Lan, et al.** 2005. Toll-like receptor-mediated responses of primary intestinal epithelial cells during the development of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**:G514-24.
 160. **Smith, P. D., L. E. Smythies, M. Mosteller-Barnum, D. A. Sibley, M. W. Russell, M. Merger, et al.** 2001. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol* **167**:2651-6.
 161. **Sokol, H., B. Pigneur, L. Watterlot, O. Lakhdari, L. G. Bermudez-Humaran, J. J. Gratadoux, et al.** 2008. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:16731-6.
 162. **Stepkowski, S. M., W. Chen, J. A. Ross, Z. S. Nagy, und R. A. Kirken.** 2008. STAT3: an important regulator of multiple cytokine functions. *Transplantation* **85**:1372-7.
 163. **Sugimoto, K., A. Ogawa, E. Mizoguchi, Y. Shimomura, A. Andoh, A. K. Bhan, et al.** 2008. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* **118**:534-44.
 164. **Suzuki, M., T. Hisamatsu, und D. K. Podolsky.** 2003. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun* **71**:3503-11.
 165. **Swidsinski, A., A. Ladhoff, A. Pernthaler, S. Swidsinski, V. Loening-Baucke, M. Ortner, et al.** 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**:44-54.
 166. **Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlrad, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, et al.** 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**:933-40.

167. **Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, et al.** 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**:10-4.
168. **Taupin, D., D. C. Wu, W. K. Jeon, K. Devaney, T. C. Wang, und D. K. Podolsky.** 1999. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest* **103**:R31-8.
169. **Taupin, D., und D. K. Podolsky.** 2003. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:721-32.
170. **Tenesa, A., und M. G. Dunlop.** 2009. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* **10**:353-8.
171. **Terzic, J., S. Grivennikov, E. Karin, und M. Karin.** 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* **138**:2101-2114 e5.
172. **Turner, J. R.** 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**:799-809.
173. **Tysk, C., E. Lindberg, G. Jarnerot, und B. Floderus-Myrhed.** 1988. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* **29**:990-6.
174. **Ungaro, R., M. Fukata, D. Hsu, Y. Hernandez, K. Breglio, A. Chen, et al.** 2009. A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**:G1167-79.
175. **Uronis, J. M., und C. Jobin.** 2009. Microbes and colorectal cancer: is there a relationship? *Curr Oncol* **16**:22-4.
176. **Uronis, J. M., M. Muhlbauer, H. H. Herfarth, T. C. Rubinas, G. S. Jones, und C. Jobin.** 2009. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One* **4**:e6026.
177. **Vaishnava, S., C. L. Behrendt, A. S. Ismail, L. Eckmann, und L. V. Hooper.** 2008. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:20858-63.
178. **Vamadevan, A. S., M. Fukata, E. T. Arnold, L. S. Thomas, D. Hsu, und M. T. Abreu.** 2009. Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis. *Innate Immun* **16**:93-103.
179. **Vijay-Kumar, M., H. Wu, J. Aitken, V. L. Kolachala, A. S. Neish, S. V. Sitaraman, et al.** 2007. Activation of toll-like receptor 3 protects against DSS-induced acute colitis. *Inflamm Bowel Dis* **13**:856-64.
180. **Visekruna, A., T. Joeris, D. Seidel, A. Kroesen, C. Loddenkemper, M. Zeitz, et al.** 2006. Proteasome-mediated degradation of I κ B α and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis. *J Clin Invest* **116**:3195-203.
181. **Waldner, M., C. C. Schimanski, und M. F. Neurath.** 2006. Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells. *World J Gastroenterol* **12**:7233-8.
182. **Waldner, M. J., und M. F. Neurath.** 2009. Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin Immunopathol* **31**:249-56.

183. **Werner, M., R. Topp, K. Wimmer, K. Richter, W. Bischof, M. Wjst, et al.** 2003. TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J Allergy Clin Immunol* **112**:323-30.
184. **Wilson, G.** 1990. Cell culture techniques for the study of drug transport. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **15**:159-63.
185. **Wilson, I. A., H. L. Niman, R. A. Houghten, A. R. Cherenson, M. L. Connolly, und R. A. Lerner.** 1984. The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* **37**:767-78.
186. **Wirtz, S., C. Neufert, B. Weigmann, und M. F. Neurath.** 2007. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* **2**:541-6.
187. **Wu, S., K. J. Rhee, E. Albesiano, S. Rabizadeh, X. Wu, H. R. Yen, et al.** 2009. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* **15**:1016-22.
188. **Xavier, R. J., und D. K. Podolsky.** 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**:427-34.
189. **Xu, Y., X. Tao, B. Shen, T. Horng, R. Medzhitov, J. L. Manley, et al.** 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**:111-5.
190. **Xue, Y., D. Yun, A. Esmon, P. Zou, S. Zuo, Y. Yu, et al.** 2008. Proteomic dissection of agonist-specific TLR-mediated inflammatory responses on macrophages at subcellular resolution. *J Proteome Res* **7**:3180-93.
191. **Yakata, Y., T. Nakayama, A. Yoshizaki, T. Kusaba, K. Inoue, und I. Sekine.** 2007. Expression of p-STAT3 in human gastric carcinoma: significant correlation in tumour invasion and prognosis. *Int J Oncol* **30**:437-42.
192. **Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, et al.** 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **169**:6668-72.
193. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, et al.** 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* **4**:1144-50.
194. **Yin, T., und K. J. Green.** 2004. Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin Cell Dev Biol* **15**:665-77.
195. **Yusuf, N., T. H. Nasti, S. K. Katiyar, M. K. Jacobs, M. D. Seibert, A. C. Ginsburg, et al.** 2008. Antagonistic roles of CD4+ and CD8+ T-cells in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene cutaneous carcinogenesis. *Cancer Res* **68**:3924-30.
196. **Zhong, Z., Z. Wen, und J. E. Darnell, Jr.** 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* **264**:95-8.

Danksagungen

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Guido Gerken und Prof. Dr. Elke Cario für die Möglichkeit zur Promotion bedanken.

Ein ganz besonders großer Dank geht an das Labor für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die erstklassige individuelle Betreuung, für die Möglichkeiten zur Veröffentlichung und Präsentation meiner Daten auf internationalen Kongressen, als auch für die immerwährende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, sowie für die Möglichkeiten, eigene Ideen zu entwickeln und zu verwirklichen.

Danken möchte ich ebenfalls Prof. Dr. Bertram Opalka für die Übernahme des Koreferats und für die Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertationsschrift.

Prof. Dr. Daniel Podolsky möchte ich für die Diskussionsbereitschaft und für die Bereitstellung verschiedener Reagenzien danken.

Der GI Company möchte ich für die Bereitstellung des rekombinanten humanen TFF3 danken.

Des Weiteren danke ich allen meinen Kollegen und Freunden in der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie und den Mitgliedern des interdisziplinären Journalclubs für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Birgit Ey möchte ich für die Anfertigung der Gefrierschnitte und H/E-Färbungen danken.

Außerdem danke ich Charlotte Beyer für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Falk Singer, der mich in der Phase des Schreibens immer motiviert hat.

Als letztes gilt mein großer Dank meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Morphologische und funktionelle Charakterisierung von Genmutationen in Toll-like Rezeptor (TLR) 2 und TLR4 bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im intestinalen Epithel“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Dipl. Biol. Annette Eyking befürworte.

Essen, den _____

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____